

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



**Perfil de expresión de microRNAs en
biopsias de testículo de pacientes con
Síndrome de Klinefelter**

TESIS DOCTORAL

Marisol Ibarra Ramírez

Madrid, 2020.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



**Perfil de expresión de microRNAs en
biopsias de testículo de pacientes con
Síndrome de Klinefelter**

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Medicina y Cirugía.

Marisol Ibarra Ramírez

Directoras de la Tesis

Laura Elia Martínez de Villarreal

María del Pilar González-Peramato Gutiérrez

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	9
RESUMEN Y ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	20
Características clínicas	21
Infertilidad	24
Aspectos genéticos del Síndrome de Klinefelter	30
Desarrollo de la azoospermia en pacientes con síndrome de Klinefelter. Aspectos genéticos.	34
Mecanismos epigenéticos: miRNAs	43
JUSTIFICACIÓN	55
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
OBJETIVO GENERAL	61
MATERIAL Y MÉTODOS	63
Diseño del estudio:	65
Criterios de eliminación	65
Obtención de muestras	65
Extracción de RNA total	66
Análisis de las muestras.	66
Análisis bioinformático.	67
Análisis estadístico	70
RESULTADOS	73
Análisis de expresión de miRNAs	76
Predicción de objetivos de los miRNAs expresados diferencialmente.	96
Sub-análisis de miRNAs	107
DISCUSIÓN	123
CONCLUSIONES	146
BIBLIOGRAFÍA	150

RESUMEN Y ABSTRACT

RESUMEN

El síndrome de Klinefelter (SK) es la aneuploidía cromosómica más común, con una prevalencia de 1:500 nacidos vivos. Una de las características distintivas del SK es la infertilidad. A pesar de los múltiples estudios que han descrito la historia natural del proceso degenerativo de las células germinales en los pacientes con SK, el o los mecanismos a nivel molecular que inician este proceso, no son bien conocidos. El mecanismo de control postranscripcional mediado por microRNAs (miRNAs) ha surgido recientemente como un importante regulador del espermatogénesis, sin embargo, son pocos los estudios que han abordado el rol de los miRNAs en el fallo gonadal de los pacientes con SK. En el presente trabajo se realizó el análisis de expresión de miRNAs en 7 muestras de tejido testicular, obtenido por biopsia, de 4 pacientes con síndrome de Klinefelter y 5 muestras de pacientes con azoospermia obstructiva, con histología normal en el tejido testicular, las cuales fueron utilizadas como grupo control. El análisis se realizó mediante secuenciación de nueva generación (NGS), se identificó un perfil de expresión diferencial entre ambos grupos. A los miRNAs diferencialmente expresados se les realizó un análisis de interacción con sus genes diana, posteriormente se realizó un análisis de enriquecimiento de los procesos biológicos Ontología Genética (GO-terms) y su posible relación en la espermatogénesis. Ciento sesenta y seis miRNAs mostraron un patrón de expresión diferencial. Cien miRNAs mostraron una regulación a la baja y 66 al alza con respecto al grupo control. Los miRNAs que fueron diferencialmente expresados tienen su interacción con genes diana que están asociados en la proliferación celular, la regulación de los procesos de desarrollo, la regulación de la diferenciación celular, el desarrollo de células germinales y el gonadal. De acuerdo a una exhaustiva revisión de la bibliografía, este es el primer reporte de perfil de expresión de miRNAs en tejido testicular de pacientes con SK.

ABSTRACT

Klinefelter syndrome (KS) is the most common sex chromosome aneuploidy, with a prevalence of 1: 500 live births.. One of the hallmarks of of KS is infertility. Despite multiple studies that have described the natural history of the degenerative process of germ cells in patients with KS, the molecular mechanisms that initiate this process are not well characterized. The post-transcriptional control mechanism mediated by microRNAs (miRNAs) has increasingly been recognized as an important regulator of spermatogenesis; however, only a few studies have addressed the role of miRNAs in the gonadal failure of patients with KS. In the present work, we describe a differential expression profile for the miRNAs performed in 7 samples of testicular tissue, obtained form diagnostic biopsies from 4 KS patients and 5 samples from patients with obstructive azoospermia, with normal histology in the testicular tissue which were used as a control group. The analysis was performed by means of new generation sequencing (NGS), which can provide information about the mechanisms involved in the degeneration of germ cells. An analysis of interaction with their target genes was performed on the differentially expressed miRNAs, later an enrichment analysis of the biological processes Genetic Ontology (GO-terms) and their possible relationship in spermatogenesis was performed. A distinctive differential expression profile was identified for 166 miRNAs in the KS patients: 66 were upregulated, and 100 were downregulated with respect to the control group. An interactome analysis was performed for 7 of the upregulated and the 20 downregulated miRNAs. The results showed that the target genes are involved in the development, proliferation, and differentiation processes of spermatogenesis, which may explain their role in the development of infertility. According to an exhaustive review of the literature, this is the first report of the expression profile of miRNAs in testicular tissue of patients with KS.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ADM	Adrenomodulina
ALDH1L1	aldehído-deshidrogenasa 1 miembro de la familia L1
AMH	Hormona antimülleriana
AR	Receptor de andrógenos
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CEM	Células no diferenciadas
CME	Células madre espermatogonias
CNVs	Variantes en el número de copias
ER	Retículo endoplásmico
FABP1	Proteína de unión a los ácidos grasos del hígado
FSH	Hormona folículo estimulante
GC-1	Germ cells -1
GO	Ontología de genes
ICSI	Inyección intracitoplasmática del espermatozoide
INSL 3	Factor similar a insulina 3
IQ	Coeficiente intelectual
JAG1	Jagged-1
K	Lisina
LH	Hormona luteinizante
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
LPA	Ácido lisofosfatídico
MGI	Mouse Genome Informatics
miRNAs	MicroRNAs
MT	Mitocondrial
PA	Ácido fosfatídico
Pre-miRNAs	miRNAs precursor

pri-miRNAs	miRNAs primarios
Release 21	miRbase
RISC	Complejo silenciador inducido por RNA
RNA _m	RNA mensajero
RNA _r	RNA ribosomal
RNA _{sn}	RNA pequeño nuclear
RNA _t	RNA de transferencia
RT-PCR	Reacción de cadena de polimerasa con transcriptasa inversa
siRNAs	Pequeños RNA de interferencia
SK	Síndrome de Klinefelter
T	Testosterona
TESE	Extracción de espermatozoides testiculares
VTN	Vitronectina
WNK	Treonina quinasa

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Klinefelter (SK) es la aneuploidía cromosómica más común, tiene una prevalencia de 1:500 nacidos vivos (Nielsen & Wohler, 1991; Bojesen et al., 2003; Gravholt et al., 2018). Fue descrito por primera vez en 1942 como un síndrome caracterizado por ginecomastia, azoospermia y elevación de la hormona folículo estimulante (FSH), (Klinefelter et al., 1942) considerando al padecimiento como de origen endocrinológico. No fue hasta 1959 en que Patricia A. Jacobs y John A. Strong descubrieron que se debía a un cromosoma X extra (47,XXY) en la dotación cromosómica sexual masculina normal (46,XY) (Jacobs et al., 1959).

Características clínicas

El SK muestra una variabilidad en la presentación de las características clínicas. Al nacimiento y en los primeros años de vida los individuos son difícilmente identificados, se pueden observar dismorfias menores como telecantho, epicantho, clinodactilia, paladar alto, razón por la cual el diagnóstico de estos pacientes representa un problema importante. Solo entre el 25-40% del conjunto de SK es diagnosticado y de éstos alrededor del 10% se diagnostican durante la infancia o en la adolescencia, (Anders Bojesen et al.; 2003; Gravholt et al., 2018).

El desarrollo sexual en estos pacientes puede ser normal antes de la pubertad presentando incluso los cambios puberales normales, niveles normales de hormona luteinizante (LH), FSH y testosterona (Groth et al., 2013). En la adolescencia, después de la pubertad, los testículos se tornan pequeños y firmes, además de presentar síntomas variados de deficiencia de andrógenos. El rango de volumen testicular referido en diferentes estudios en pacientes con síndrome de Klinefelter, oscila entre 1-7 ml. (Lanfranco et al., 2004; Aksglaede et al., 2011; Groth et al., 2013; Gravholt et al., 2018). El hipogonadismo

hipergonadotrófico es la característica predominante, con niveles de testosterona por debajo de 12 nmol/L.

El factor similar a insulina 3 (INSL 3), la inhibina B y la hormona antimülleriana (AMH) se encuentran disminuidas, mientras que la FSH y la LH están elevadas. (Bay et al., 2005; Aksglaede et al., 2011; Groth et al., 2013). En la descripción del síndrome por Klinefelter *et al.*, se encontró ginecomastia en los nueve sujetos reportados y se consideró éste un rasgo característico del padecimiento (Klinefelter et al., 1942). Estudios posteriores han encontrado que la ginecomastia es menos común en SK, solo entre el 38-75 %, aunque la ginecomastia puberal persistente, sigue siendo un signo importante para la sospecha diagnóstica de SK (S. Ratcliffe, 1999; Groth et al., 2013).

Los pacientes con SK tienen un crecimiento acelerado desde la primera infancia y tienden a ser más altos que los controles, en promedio 5-7 cm más (Chang et al., 2015). La talla alta se atribuye principalmente a tener una mayor longitud en las piernas. (Lanfranco et al., 2004). Existe una desproporción de la relación entre músculo/grasa, debido a la disminución de la masa muscular y aumento de la grasa corporal, junto con niveles de leptina elevados. Además, en la vida adulta tienen un riesgo cinco veces mayor de desarrollar síndrome metabólico en comparación con los individuos con fórmula cromosómica normal de la misma edad. (Bojesen et al., 2006). También se observa con mayor frecuencia obesidad, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2, lo que incrementa la mortalidad en estos pacientes. (Lanfranco et al., 2004; Swerdlow et al., 2005; Gravholt et al., 2018). Otra alteración metabólica en estos pacientes es la disminución de la densidad ósea debida al hipogonadismo, (Lanfranco et al., 2004; Swerdlow et al., 2005), lo cual incrementa el riesgo de fracturas, el cual disminuye con la administración oportuna de testosterona.

Los pacientes con SK presentan riesgo incrementado de padecer diversas enfermedades tales como cardiovasculares y cerebrovasculares, refiriéndose hasta dos veces más frecuentes que en la población general (Swerdlow et al., 2005; Bojesen et al., 2004), por otro lado, tienen entre 4-8 veces más riesgo de trombosis venosa (Campbell & Price, 1981). Otras patologías que también se presentan más frecuentemente en estos pacientes son cáncer de mama y otras neoplasias como leucemia y tumores de mediastino, cuyo mecanismo de asociación con el SK no es bien conocido (Swerdlow et al., 2006).

El mayor riesgo de enfermedades inmunes en pacientes con 47,XXY, ha sido referido por diversos autores. (Swerdlow et al., 2005; Sawalha et al., 2009; Seminog et al., 2015). Este aumento en la enfermedad autoinmune es probablemente debido al cromosoma X extra, aunque no se han identificado genes o mecanismos genéticos específicos. En particular, se ha informado que el riesgo de lupus eritematoso sistémico, en comparación con la población masculina en general, es 14 veces mayor, es decir, similar al riesgo en las mujeres, lo que sugiere un efecto de dosis génica del cromosoma X (Rovenský, 2006).

El SK se caracteriza por una serie de deficiencias cognitivas, entre las que se encuentran el coeficiente intelectual (IQ), lenguaje y el funcionamiento ejecutivo. El IQ de escala completa es típicamente menor que en sujetos sanos, promediando aproximadamente 10 puntos por debajo de la población general (Skakkebak et al., 2015; Ratcliffe, 1999). El déficit verbal se encuentra entre las características más comunes del paciente con SK, presente en el 70-80% (Ratcliffe, 1982). También se ha reportado una mayor incidencia de trastornos psiquiátricos comparados con la población general. (Bancroft et al., 1982; Bruining et al., 2009).

Los estudios que han investigado la estructura del cerebro en hombres SK describen un volumen cerebral total, volumen total de materia gris y volumen total de materia blanca

más pequeño en comparación con hombres 46, XY (Giedd et al., 2007; Ruigrok et al., 2014).

Los pacientes con mosaicos cromosómicos comúnmente muestran muy pocos síntomas clínicos y los testículos pueden tener un tamaño normal. Las anormalidades endocrinas, la ginecomastia y la azoospermia son menos frecuentes. (Lanfranco et al., 2004) Por el contrario el fenotipo se modifica a medida que aumenta el número de cromosomas X, en casos de pacientes con 48,XXXY y 49,XXXXY, la frecuencia de casi cualquier anomalía somática se incrementa en comparación con pacientes 46,XXY. La talla está inversamente relacionada con la cantidad de cromosomas X. (Visootsak et al., 2001).

Infertilidad

Una de las características distintivas del SK es la infertilidad, representan alrededor del 10% de los casos de azoospermia (Gravholt et al., 2018). Los hombres con SK por lo general tienen testículos pequeños y muestran una extensa fibrosis y hialinización de los túbulos seminíferos (Aksglæde et al., 2006). Durante la pubertad, los testículos de los pacientes con SK crecen y alcanzan un volumen de 6 ml, sin embargo, cuando los niveles séricos de testosterona aumentan, se presenta una disminución de las células germinales, hialinización de los túbulos seminíferos, degeneración de las células de Sertoli e hiperplasia de las células de Leydig. (Wikström, Painter, et al., 2006).

La histología del testículo en pacientes adultos con SK, se caracteriza por fibrosis extensa y hialinización de los túbulos seminíferos e hiperplasia de células de Leydig en el intersticio, bien difusa o nodular y algunos autores refieren un patrón de solo células de Sertoli (Foresta et al., 1999). En esta etapa de la vida, la mayoría de los pacientes presentan hipogonadismo hipergonadotrópico, caracterizado por niveles bajos a bajos normales de testosterona, altos niveles de FSH y LH y niveles indetectables de inhibina B sérica. (Lanfranco et al., 2004).

Aunque el espermiograma de los pacientes adultos con SK revela con mayor frecuencia azoospermia, algunos hombres con el diagnóstico de SK pueden tener focos residuales de espermatogénesis (Foresta et al., 1999). De hecho, se han encontrado espermatozoides en el semen en el 7.7% -8.4% los pacientes con SK (Foresta et al., 1999; Lanfranco et al., 2004; Selice et al., 2010). Desafortunadamente la concepción natural rara vez ocurre para las parejas de SK y la mayoría de las veces la única esperanza para la paternidad biológica es la extracción de espermatozoides testiculares (TESE) combinada con ICSI. En un meta-análisis reciente, la tasa de éxito general de encontrar espermatozoides en pacientes con SK, después de TESE, fue del 40% (Corona et al., 2017), sin embargo, siguen siendo limitadas las opciones reproductivas en estos pacientes, agravadas por el hecho de que los mecanismos subyacentes que producen la degeneración de las células germinales aún no han sido aclarados.

Las frecuencias de los diferentes hallazgos clínicos se expresan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características clínicas en Síndrome de Klinefelter.

Características	Frecuencia (%)
Infertilidad	>99
Azoospermia	>95
Volumen testicular disminuido	>95
Niveles de gonadotropina elevadas	>75
Niveles de testosterona disminuidos	>75
Disminución del tamaño del pene	10---25
Ginecomastia	28-75
Criptorquidia	27-37
Prolapso de la válvula mitral	0-50
Enfermedad isquémica del corazón	~ 1.5 riesgo aumentado al doble
Trombosis venosa profunda y embolismo pulmonar	3-6 riesgo aumentado al doble
Discapacidad intelectual	>75
Trastorno del espectro autista	30-50
Retraso en el desarrollo del habla	>40
Trastorno psiquiátricos	<25
Aumento de la talla	>30
Adiposidad abdominal	~50
Síndrome metabólico	46
Diabetes tipo 2	10----39
Osteopenia	~40
Fracturas	Riesgo aumentado (2-40)
Osteoporosis	5----10
Disminución de la masa muscular y de la fuerza	~40
Osteoartritis	Aumento del riesgo (~4)
Autoinmunidad	Riesgo aumentado en enfermedades autoinmunes severas
Cáncer de mama	Aumenta el riesgo (~4)

Diagnóstico

El diagnóstico se sospecha en función de los hallazgos clínicos y hormonales, pero requiere una confirmación por análisis citogenético. El diagnóstico de SK se basa en la demostración de la aneuploidía mediante la práctica de un cariotipo convencional. El estudio citogenético debe incluir un recuento de al menos 30 metafases para poder excluir mosaicos mayores a un 10 % con un intervalo de confianza del 95%. (Barch et al., 1997). Es importante hacer notar que del 85-90% de los casos de SK presentan una fórmula cromosómica de 47, XXY, mientras que los mosaicos (47,XXY/46,XY) y aneuploidías que involucran más cromosomas (48, XXXY o 48,XXYY), constituyen aproximadamente el 10-15% restante de los casos.

El mosaicismo puede estar limitado a un tejido, lo que dificulta su diagnóstico a menos que se estudie el tejido afectado, por lo cual se piensa que debe haber un sub-diagnóstico importante de estos casos. (Lanfranco et al., 2004; Bonomi et al., 2017) . La prevalencia de las alteraciones estructurales (Ej. isocromosoma de los brazos largos del cromosoma X 47,iXqY) se estima de entre 0.3-0.9 % de los casos de Klinefelter (Arps et al., 1996; Lanfranco et al., 2004; Frühmesser & Kotzot, 2011) Figura 1 muestra los diferentes complementos cromosómicos en pacientes con SK.

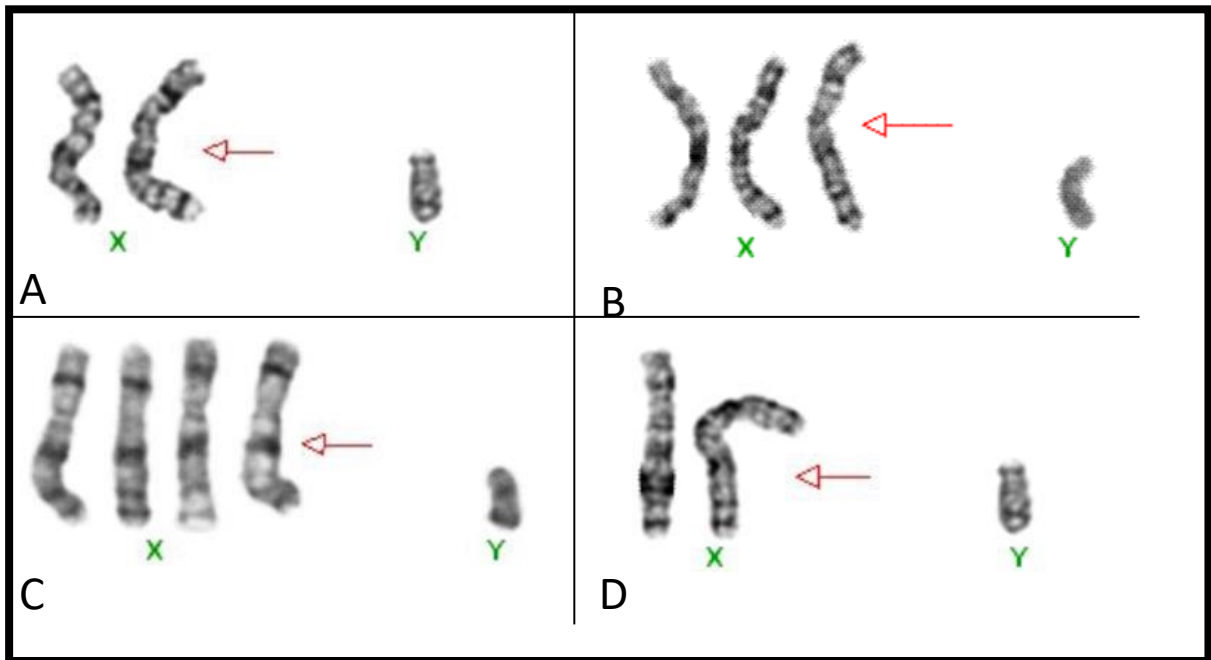


Figura 1. Ejemplos de los diferentes complementos cromosómicos observados en los pacientes con Síndrome de Klinefelter. A. Muestra el complemento sexual más frecuente observado en SK (47,XXY), B. y C. Muestran aneuploidías menos frecuentes 48, XXXY y 49, XXXXY, asociadas a un fenotipo más severo que muestra múltiples alteraciones y por último la variante cromosómica de tipo estructural el isocromosoma de brazos largo del X.(Casos propios)

Etiología

La causa por la que se genera esta aneuploidía sexual es fundamentalmente por un proceso de no disyunción, ya sea durante la meiosis o en la mitosis en estadios tempranos del desarrollo embrionario. Cerca de la mitad de los casos ocurren por una no disyunción paterna en meiosis I, el resto ocurren en meiosis materna I y materna II (Figura 2). La no disyunción representa el fallo en para separarse en el anafase del cromosoma homólogo si es meiosis I, la cromátide hermana (meiosis II) o en la mitosis de los estadios tempranos de división celular después de formado el cigoto, que da lugar a células con un número aberrante de cromosomas. Esto podría ocurrir durante la ovogénesis o la espermatogénesis. Se ha informado que una edad materna avanzada, es un factor de riesgo para SK. Algunos autores

refieren un aumento de 4 veces en la prevalencia de casos de SK de las madres de más de 40 años, en comparación con las madres de menos de 24 años (Anders Bojesen et al., 2003; Bonomi et al., 2017). El efecto de la edad materna también se mostró en pacientes con SK en la no disyunción mitótica post-cigótica. De hecho, las tres primeras divisiones mitóticas están controladas por proteínas y RNA de origen materno; por lo tanto, con el aumento de la edad de la madre, la probabilidad de errores mitóticos aumenta (Bonomi et al., 2017). Por el contrario, la edad paterna avanzada aún no ha podido ser asociada de manera contundente con un mayor riesgo para el desarrollo de aneuploidias (Fonseka & Griffin, 2011; Bonomi et al., 2017).

El origen del cromosoma X supernumerario se ha asociado con diferencias fenotípicas en los pacientes con SK aunque la evidencia no es concluyente (Stemkens et al., 2006; Gravholt et al., 2018). En particular, se ha informado que los pacientes con SK con un origen paterno del cromosoma X supernumerario tienen un inicio más tardío de la pubertad (Wikström, Painter, et al., 2006) otros rasgos fenotípicos en los cuales se encontró una asociación con el origen parental del cromosoma X supernumerario incluyen: la alteración en la función motora y el lenguaje (Stemkens et al., 2006), rasgos autistas y esquizotípicos, (Bruining et al., 2010) así como la diferencia talla de la cintura y la longitud del brazo (Bruining et al., 2010; Chang et al., 2015).

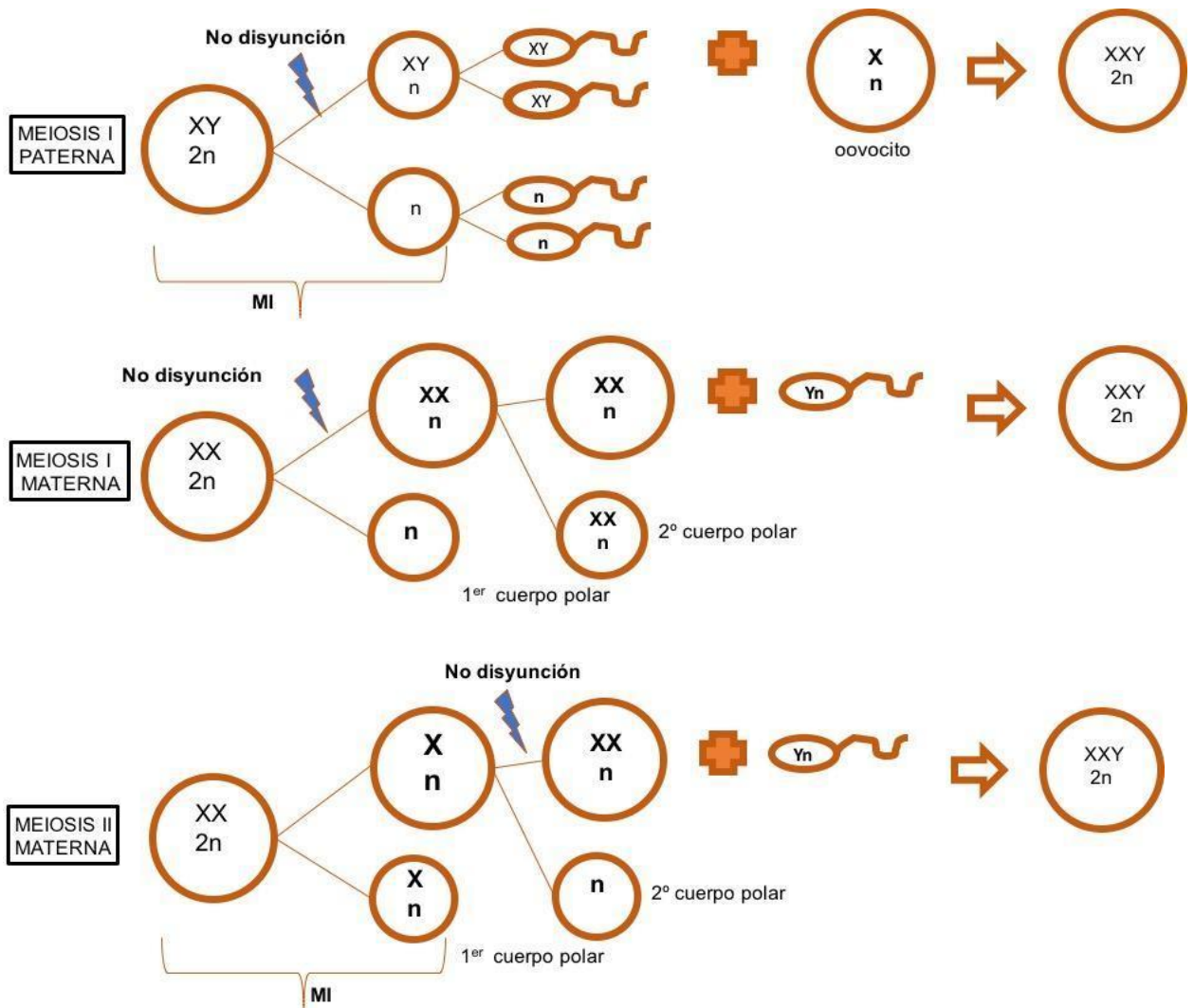


Figura 2. La No-disyunción de origen materno y paterno que genera la aneuploidias en Síndrome de Klinefelter. En la meiosis paterna solo se presenta en Meiosis I ya que una no-disyunción de meiosis paterna II, genera Síndrome de XYY o la polisomía del X (XXX).

Aspectos genéticos del Síndrome de Klinefelter

El cromosoma X tiene 155 millones de pares de bases de longitud y contiene más de 1000 genes, (Yang et al., 2011) mientras que el cromosoma Y tiene una longitud de 60 megabases y cuenta con más de 200 genes de los cuales solo 104 son codificantes (Bukulmez, 2012; Yang et al., 2011). Ante tal diferencia en la dotación génica de los cromosomas sexuales entre hombre y mujeres, es el mecanismo de la inactivación del cromosoma X quien permite un equilibrio entre ambos sexos. Lyon estipula que esta inactivación se produce en todas las células, de forma aleatoria, y desde los primeros estadios de la división celular del

cigoto; el cuerpo de Barr (cromatina sexual) representa el cromosoma X inactivo visible e identificable microscópicamente en las células que tienen más de un cromosoma X. (Lyon, 1961). Sin embargo, alrededor de un 15% de los genes localizados a lo largo del cromosoma X escapan a la inactivación y se expresan de forma bi-alelica (Berletch et al., 2011). La gran mayoría de los genes que escapan a la inactivación se encuentran en las regiones denominadas pseudoautosómicas 1 y 2 (PAR1 y PAR2) y cuentan con genes homólogos en las regiones del cromosoma Y, además de ser las únicas regiones en realizar recombinación meiótica entre los cromosomas X y Y (Disteche et al., 2002).

PAR1 comprende 2,6 Mb del brazo corto de los cromosomas X e Y en humanos (Blaschke & Rappold, 2006; Mangs et al., 2007). Todos los genes en PAR1 escapan a la inactivación X, la cual contiene por lo menos 24 genes, de los cuales solo la mitad tienen una función conocida (Blaschke & Rappold, 2006; Bonomi et al., 2017). La PAR2 se encuentra en el extremo distal de los brazos largos y es una región mucho más pequeña que abarca sólo 320 kb. Presenta una frecuencia menor de recombinación y está compuesta en su mayoría por pseudogenes. Se han identificado 4 genes localizados en dirección centro-telomérica *HSPRY3*, *VAMP7*, *IL9R* y *CXYorf1* (Mangs et al., 2007). El entrecruzamiento de los cromosomas X e Y, en la meiosis masculina de la PAR 1, es un proceso que se sabe tiene una función crítica en la espermatogénesis, al menos en humanos y ratones (Mohandas et al., 1992; Bonomi et al., 2017), por lo cual la presencia de un cromosoma extra pudiera afectar la espermatogénesis en los individuos con SK y tener una influencia importante en la relación al desarrollo de la azoospermia.

La alteración más probable que pudiera explicar el fenotipo en los individuos con SK es la dosis génica aumentada de los genes que escapan a la inactivación del cromosoma X, un claro ejemplo de este mecanismo se demuestra con el gen *SHOX* (Short-stature Homeobox) localizado en la PAR1, que escapa a la inactivación del cromosoma X. *SHOX*

muestra una relación-efecto de la dosis génica y la talla de los individuos, así como alteraciones esqueléticas (Marchini et al., 2007; Bonomi et al., 2017), presentando una talla baja en las pacientes con Síndrome de Turner, que clásicamente tienen la pérdida de uno de los alelos de este gen, mientras que en el SK la talla alta está en relación con las tres copias de *SHOX* que presentan estos individuos.

Aunque el efecto de la dosis génica aumentada por tener un cromosoma X más puede explicar algunos de los rasgos fenotípicos observados en pacientes con SK, ésta no explica toda la variabilidad observada en el fenotipo de los pacientes con SK, por lo cual deben ser estudiados nuevos mecanismos que nos permitan entender esta variabilidad. Recientemente Belling, et al. evaluaron la expresión génica en sangre periférica en hombres con SK y sujetos sanos e identificaron 363 genes expresados diferencialmente, de los cuales la mayoría se ubicaron en cromosomas autosómicos, (Belling et al., 2017). De estos estudios se pudiera inferir que los cromosomas sexuales pueden regular la expresión génica en todo el genoma incluyendo genes localizados en los cromosomas autosómicos, como ya está comunicado que sucede en otras aneuploidías cromosómicas (Antonarakis, 2017).

La presencia de variantes en el número de copias (CNVs) podría alterar la dosis génica en pacientes con SK. Las CNVs ya sea deleciones o duplicaciones tienen un impacto clínico en el desarrollo de diferentes enfermedades (Gai et al., 2010) incluida la infertilidad masculina y en trastornos en la diferenciación sexual, por lo cual se debe considerar su posible implicación en la variabilidad clínica en SK. Rocca *et al.* refirieron que los pacientes con SK tienen más frecuencia de CNVs en el cromosoma X (41.5%) comparado con al 28.6% en las mujeres y el 18.6% de los hombres sanos, lo cual pudiera influir en las variaciones en el fenotipo de los individuos con SK. (Rocca et al., 2016). Es interesante comentar que duplicaciones en el gen *VAMP7* se han asociado a trastornos de desarrollo genitourinario masculino. Dicho gen se localiza en la PAR2 y escapa a la inactivación del X, por lo cual es

un candidato a estudiar en los pacientes con SK (Tannour-Louet et al., 2014).

La variabilidad en el número de repeticiones de CAG en el exón 1 del gen del receptor de andrógenos (*AR*) localizado en el cromosoma X, se ha investigado con el objetivo de encontrar una relación con la variabilidad fenotípica observada en SK, ya que el número de la repeticiones de CAG afecta a la función del *AR* (Chamberlain et al., 1994). Los resultados de dicha asociación son controvertidos ya que mientras unos autores describen que el número de repeticiones de CAG del *AR* explica parte de la variabilidad observada en el fenotipo de pacientes con SK, particularmente los aspectos antropométricos, con una correlación positiva con la altura y la brazada (Bojesen et al., 2011), para otros, dichos hallazgos son más inconsistentes. No se ha descrito asociación en el número de repeticiones CAG y otras características clínicas (Gravholt et al., 2018).

Por otro lado, se han explorado mecanismos epigenéticos con la finalidad de encontrar explicación a la expresión fenotípica en el SK, basados en el hecho de que la inactivación de X es un mecanismo involucrado directamente en este padecimiento, ya que el cromosoma X supernumerario también es inactivado. Sin embargo, el 15% de los genes escapan a esta inactivación y se desconoce de qué manera esto puede influir en las modificaciones epigenéticas de otras regiones en el genoma. El proceso natural de la inactivación del cromosoma X se produce fundamentalmente a través de la expresión del gen *XIST* que genera un RNA largo no codificante, el cual se esparce a lo largo del cromosoma X y genera la inactivación. Por lo tanto, la expresión de *XIST* indica la presencia de un segundo o cualquier otro número de cromosomas X supernumerarios como en el caso de aneuploidías sexuales (SK y polisomía del X) (Penny et al., 1996; Gravholt et al., 2018). Existen publicaciones que demuestran que la metilación de *XIST* en pacientes con SK y en el modelo animal de ratón 41, XXY SK, es comparable con la observada en sujetos femeninos (Poplinski et al., 2010); lo anterior, junto con estudios publicados que demuestran cambios

en los perfiles de metilación en tejidos como sangre y cerebro de pacientes con SK, son evidencia de que la epigenética puede influir en el fenotipo del paciente con SK (Viana et al., 2014; Sharma et al., 2015). Sin embargo, se requieren más estudios en otros tejidos, además de explorar otros mecanismos epigenéticos tales como RNA no codificantes, de interferencia y miRNAs, análisis del transcriptoma y proteoma en diferentes tejidos, que pueden arrojar valiosa información en relación a su influencia con el fenotipo del síndrome de Klinefelter.

Desarrollo de la azoospermia en pacientes con síndrome de Klinefelter. Aspectos genéticos.

En los humanos, el sexo está determinado por la constitución de los cromosomas sexuales. En el momento de la concepción, los embriones de ambos sexos difieren solo en su cariotipo: los varones son XY y las mujeres son XX. Comenzando en la tercera semana de gestación, determinados genes específicos conducen a la diferenciación de las gónadas, que, a su vez, producen hormonas que inducen diferencias anatómicas y fisiológicas en genitales internos y externos.

A las 5 semanas de gestación, los primordios gonadales bipotenciales, las crestas genitales, ya son visibles en humanos. ((Eid & Biason-Lauber, 2016). La formación temprana de crestas genitales indiferenciadas es un requisito para desarrollo testicular. Los genes requeridos para la formación de la gónada bipotencial descritos hasta la fecha son: *EMX2*, *GATA4*, *LHX9*, *WT1*, *SF-1* (Bukulmez, 2012; Eid & Biason-Lauber, 2016). La Tabla 2 recoge los genes relacionados con la diferenciación y desarrollo genital masculino.

El desarrollo genital masculino, depende primordialmente de la expresión de gen *SRY* cuyo nombre deriva del acrónimo (*Sex-determining región of the Y*) un factor de transcripción, que consiste en un solo exón y codifica para una proteína de 204 aminoácidos, determinante para iniciar la diferenciación de las gónadas masculinas, el cual actúa sobre un

conjunto específico de células de la cresta genital para estimularlas a diferenciarse como células de Sertoli. *SRY* activa otros factores de transcripción como *SOX9*, *SOX8*, *DAX-1* y el factor de crecimiento de fibroblastos 9 *FGF9*, que tienen papeles importantes en la diferenciación y función de las células de Leydig.

Tabla 2. Genes relacionados a la diferenciación y desarrollo genital masculino. *DSD Trastorno de la diferenciación sexual.

Genes	Locus	Función	Fenotipo
Genes involucrados en el desarrollo de la gónada bipotencial			
<i>EMX2</i>	10q22.11	Factor de transcripción	Riñón único, discapacidad intelectual, 46 XY DSD
<i>LHX9</i>	1q31.3	Factor de transcripción	
Genes involucrados en el desarrollo testicular			
<i>DHH</i>	12q13.12	Molécula de señalización	Perdida de función: XY parcial o completa disgenesia gonadal
<i>DMRT1</i>	9p24.3	Factor de transcripción	Homocigoto: XY disgenesia gonadal
<i>ATRX</i>	Xq21.1	Re-modelamiento de cromatina	Disgenesia Testicular
<i>ARX</i>	Xp21.3	Factor de transcripción	Disgenesia testicular, genitales ambiguos
<i>GATA4</i>	8p23.1	Factor de transcripción	Perdida de función: XY genitales ambiguos, reducción de la longitud del pene
<i>MAP3K1</i>	5q11.2	Quinasa	XY parcial o completa disgenesia gonadal
<i>NR5A1</i>	9q33.3	Receptor nuclear/ Factor de transcripción	Síndrome de regresión embrionaria testicular, XY disgenesia gonadal
<i>NR0B1</i>	Xp21.2	Receptor nuclear	Perdida de la función/Deleción: Hipoplasia suprarrenal congénita
<i>WT1</i>	11p13	Factor de transcripción	Síndrome de Denys-Drash, WAGR y Fraiser
<i>WWOX</i>	16q23.1-q23.2	Reductasa	Disgenesia Testicular
<i>TSPYL1</i>	6q22.1	Modificador de cromatina	Disgenesia testicular y genitales ambiguos
<i>SOX9</i>	17q24.3	Factor de transcripción	XY disgenesia gonadal combinada con displasia campomélica -Ganancia de función: 46, XX DSD -Duplicaciones incluida SOX9: XX testicular DSD
<i>MAMLD1</i>	Xq28	Co-activador de la transcripción	Hipospadias
<i>SRY</i>	Yp11,2	Factor de transcripción	Perdida de la función: XY DSD ovárico
<i>CBX2</i>	17q25.3	Factor de transcripción	Reversión sexual 46,XY

Aproximadamente de 5 a 6 semanas después de la fecundación, las células germinales bipolares primitivas, que se originaron en el saco vitelino, migran a lo largo del mesenterio dorsal hacia la cresta urogenital, guiadas por señales quimiotácticas (Hughes, 2001). El primer signo de la diferenciación testicular es la agregación de las células que darán origen a las células de Sertoli para formar los cordones sexuales primarios. Unas semanas más tarde, las células mesenquimales (células de Leydig nacientes), intercaladas entre los cordones sexuales en desarrollo, comienzan a secretar testosterona y INSL3 mientras que las de células de Sertoli producen AMH ya para el final de la 9 semana. La testosterona secretada localmente estimula la morfogénesis de los conductos mesonéfricos (de Wolff) que dará origen a los tercios distales del epidídimo, el conducto deferente, la vesícula seminal y el conducto eyaculador, mientras que la AMH desencadena la regresión de los conductos paramesonéfricos o de Müller. En una etapa mucho más tardía de la embriogénesis y el crecimiento fetal, la conversión periférica de testosterona (T) a dihidrotestosterona a través de la 5alfa-reductasa inicia la diferenciación y desarrollo genital externo masculino, mientras que el INSL3 es necesario para un adecuado descenso testicular (Ferlin et al., 2008). La figura 3 sintetiza los procesos de la diferenciación sexual masculina.

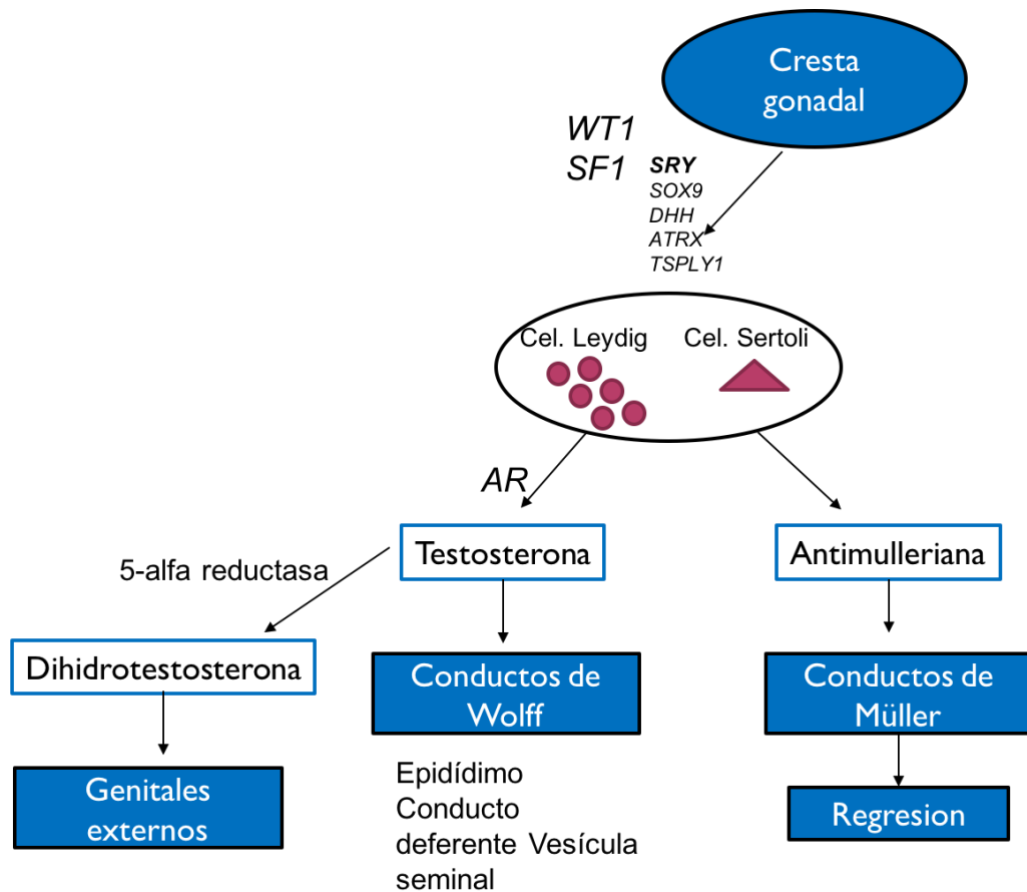


Figura 3. Esquema general de los procesos que generan la diferenciación sexual masculina.

Lue et al, basado en el análisis de los modelos de ratón 41,XXY, propone que la migración de células germinales y el desarrollo de los testículos es normal, pero la proliferación mitótica y la expansión en el número de células germinales se reduce a medida que se desarrolla el testículo. Estos autores demostraron que al trasplantar células germinales XY en el tejido testicular del modelo 41,XXY, sólo algunas de esas células donantes podrían completar la espermatogénesis, lo que sugiere que tanto la célula germinal XXY como el ambiente XXY contribuyen a la alteración del espermatogénesis (Lue et al., 2010). De acuerdo a lo publicado por Hunt et al., esto puede deberse a la reactivación del cromosoma X adicional cuando las células germinales llegan a su destino, pero también se propuso que esta reducción estaba relacionada con un defecto en la comunicación entre las células germinales y las células de Sertoli (Hunt et al., 1998), sugiriendo que los mecanismos

implicados en esta degeneración puedan estar en relación a la dosis génica de genes que escapen a la inactivación del X.

Estudios de biopsias testiculares de fetos 47,XXY, productos de abortos entre las 18-22 semanas de gestación, muestran un número significativamente menor de células germinales, mientras que la densidad y el número de túbulos seminíferos y estructuras mesenquimales parecen estar normales, incluida la morfología de las células de Leydig. (Coerdet et al., 1985) Sin embargo, en una reciente revisión de Davis et al, se discute sobre el número de estudios y el número de casos analizados en cada uno de ellos, el cual en general es bajo para realizar una conclusión con suficiente evidencia, por lo que la información disponible sigue siendo fundamentalmente de lo detallado en los modelos murinos. (Davis et al., 2015).

De acuerdo a diversos estudios, no existen diferencias en la concentración de testosterona en líquido amniótico entre fetos masculinos con 47,XXY y 46,XY. (Davis et al., 2015). Por otro lado, se ha publicado una disminución en el número de espermatogonias en recién nacidos con SK y durante el primer año de vida (Mikamo et al., 1968) (Edlow, 1969), aunque Müller et al. no encontraron dicha disminución en testículos no descendidos de un paciente con SK al mes de vida. (Müller et al., 1995).

Mini-pubertad, es el término utilizado para describir el aumento de las gonadotropinas hipofisarias que conduce a un incremento temporal de la secreción de testosterona y del número absoluto de células de Sertoli, aunado a la transformación y expansión del número de espermatogonias durante los primeros 2-4 meses de vida del varón (Zivkovic & Hadziselimovic, 2009). Por tanto, una alteración durante esta fase normal del desarrollo testicular, puede generar un recuento reducido de espermatozoides en el futuro (Hadziselimovic et al., 2005). Analizar cómo se desarrolla la minipubertad en los pacientes

con SK podría arrojar información relevante sobre el desarrollo de la degeneración de las células germinales. Diversos estudios han mostrado niveles de testosterona, así como de LH, FSH, inhibina B y AMH dentro de límites normales durante este periodo en pacientes con SK, aunque algunos refieren que, comparado con sujetos sanos, la concentración de testosterona es significativamente más baja (Lahlou & Roger, 2004; Ross et al., 2005; Aksglaede et al., 2007). Por lo anterior, la dinámica de minipubertad hormonal parece ser similar a la encontrada en niños no afectados de SK, sin diferencias muy marcadas entre los grupos evaluados.

Desarrollo de la azoospermia en pacientes con síndrome de Klinefelter. Aspectos histológicos y hormonales

En niños prepúberes con SK el volumen testicular es pequeño, a menudo de 1 ml o menos, y los niveles séricos de testosterona, FSH, LH e inhibina B son normales hasta el inicio de la pubertad (Davis et al., 2015). En esta etapa de la vida de los niños con Klinefelter, la histología testicular es similar a la descrita en el feto con esta aneuploidia. En general todos los estudios muestran que existe preservación de túbulos seminíferos, pero con un número reducido de células germinales, mientras que las células de Sertoli y las células de Leydig son normales (Wikström, Painter, et al., 2006). Las biopsias de niños prepúberes y en inicio de la pubertad (10-14 años), muestran que las células germinales están marcadamente reducidas en número y no es posible observar células germinales divididas meióticamente, ni espermátidas postmeióticas (Wikström et al., 2004).

En la mayoría de los niños con cariotipo 47,XXY hay un aumento de la testosterona a lo largo de la pubertad, alcanzando eventualmente niveles normales-bajos a medida que comienza el proceso puberal, produciéndose virilización, hay crecimiento del pene, se desarrollan el vello púbico, la capacidad erétil y la libido, pero el crecimiento de la barba y

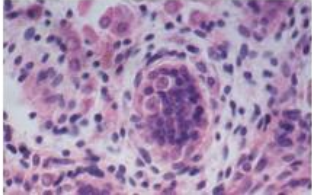
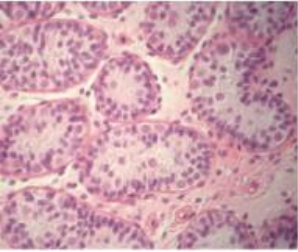
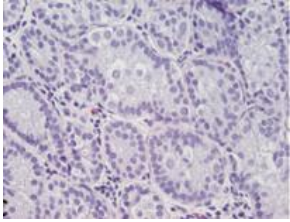
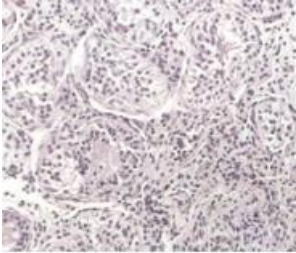
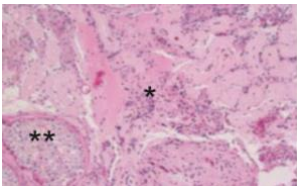
el desarrollo muscular es menor en comparación con los individuos 46,XY (Oates, 2012; Davis et al., 2015).

INSL3 es un marcador de la función de las células de Leydig y su nivel aumenta en niños con fórmula cromosómica 47,XXY al comienzo de la pubertad, a la misma velocidad que los niños 46,XY (Wikström, Bay, et al., 2006). De manera similar, la inhibina B refleja la función de las células de Sertoli pero con una influencia de las células germinales a partir de la pubertad, razón por la cual a medida que avanza la pubertad los niveles de inhibina B disminuyen rápidamente, mientras que la AMH, otro producto de células de Sertoli, disminuye de forma paulatina a lo largo de la pubertad en los pacientes con SK, lo anterior probablemente debido a la esclerosis y la pérdida de células de Sertoli que se produce (Wikström, Bay, et al., 2006). La producción hipofisaria de FSH y LH aumenta de forma gradual y constante a medida que avanza la pubertad, lo que indica una respuesta compensatoria a la disminución de la inhibición por retroalimentación de la inhibina B y la testosterona, respectivamente (Aksglaede et al., 2008).

El adulto con SK generalmente tiene testículos con un volumen más pequeño que durante la pubertad y la histología testicular generalmente revela la ausencia de células germinales, presencia de tubos seminíferos con solo células de Sertoli, fibrosis e hialinización de los túbulos seminíferos. En el intersticio es frecuente la hiperplasia de células de Leydig (Klinefelter et al., 1942; Nistal et al., 1982; Aksglaede et al., 2006; Aksglaede et al., 2011) . Desde entonces, muchos estudios han evidenciado la naturaleza irregular de la histología testicular con unas áreas más afectadas y otras menos afectadas. Se mantiene la franca elevación de FSH y LH. La inhibina B generalmente es menor que el rango normal, mientras que la AMH es a menudo indetectable, y los niveles de testosterona son bajos (Bay et al., 2005; Aksglaede et al., 2008; Aksglaede et al., 2011; Oates, 2012; Davis et al., 2015).

Los diferentes aspectos morfológicos del parénquima testicular en pacientes con SK en las sucesivas etapas de la vida se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Características histológicas del testículo en diferentes etapas de la vida en pacientes con SK. Imágenes tomadas de Aksglæde et al. 200).

Período fetal	
	Reducido número de células germinales puede estar presentes desde el nacimiento en niños con Síndrome de Klinefelter. Testosterona total en líquido amniótico es normal en la mayoría, pero hay un déficit en la producción de testosterona en algunos sujetos.
Infancia	
	A pesar de que las células parecen normales, una depleción de células germinales está presente en la infancia y posiblemente progresivo. El volumen testicular puede ser normal al nacimiento con una disminución del crecimiento después del primer año. Testosterona total en suero probablemente anormal durante la pre-pubertad en la mayoría de los infantes con Síndrome de Klinefelter. Células de Sertoli potencialmente disfuncionales en unos sujetos.
Pre-pubertad	
	Testículos en la pre-pubertad pueden ser más pequeños. Depleción de células germinales ocurren en todos los niños. Disfunción de las células de Sertoli y Leydig pueden estar presentes en este grupo de niños.
Pubertad	
	El testículo aumentan de tamaño en su mayoría, el tamaño testicular es variable pero típicamente no más que ~ 8 ml antes de disminuir 3-5 ml en la pubertad tardía. Aunque en la pubertad temprana el tamaño testicular es menos que lo esperado para el grado de virilización. La espermatogénesis es alterada en todos los niños con Síndrome de Klinefelter; Las células de soporte testicular se vuelven anormales en cuanto la pubertad es iniciada, y la fibrosis probablemente progresa con la pubertad. La mayoría de los niños con Síndrome de Klinefelter tendrán evidencia de una deficiencia de las células de Leydig en la pubertad media o tardía. La mayoría de los niños con Síndrome de Klinefelter tendrán biomarcadores anormales de las células de Sertoli en la pubertad temprana o media.
Adultez	
	Adultos con 47, XXY tienen testículos pequeños. Células germinales están ausentes o escasas; células de Leydig o Sertoli son anormales, pero pueden haber focos de células normales. La mayoría tendrá disfunción de las células de Leydig; sin embargo puede ser leve en unos sujetos. Biomarcadores de la función de las células de Sertoli y las células germinales con rangos bajos.

A pesar de los múltiples estudios que han descrito la historia natural del proceso degenerativo de las células germinales en los pacientes con Síndrome de Klinefelter, el o los mecanismos a nivel molecular que inician este proceso, no son bien conocidos.

La mayoría de las teorías propuestas es que se debe a un proceso generado por la alteración en la expresión de los genes que escapan a la inactivación del X. Varios genes presentes en el cromosoma X se expresan en el testículo, por lo cual una dosis génica anormal puede ser parcial o totalmente responsable de la degeneración de la espermatogonia en el paciente 47,XXY (Pessia et al., 2012).

Interesantemente, Yu, et al. reportaron la existencia de la proteína TEXT 11, la cual es específica de células germinales y cuyo gen se localiza en el cromosoma X. En las células germinales, como espermatogonias y espermatocitos, la expresión aumentada de TEX11 puede contribuir parcialmente a un defecto en la espermatogénesis, lo que ha sido observado en los pacientes con síndrome de Klinefelter, ya que tiene un efecto negativo sobre la proliferación celular (Yu et al., 2012).

También es plausible que el estado aneuploide pueda jugar un papel en la meiosis desordenada y la apoptosis final de estas primeras espermatogonias 47, XXY (Oates, 2012). Por lo cual la sobre expresión de los genes que escapan a la inactivación del cromosoma X, son candidatos a estudiar para entender el proceso que afecta la espermatogénesis en estos pacientes.

Recientemente diversos autores han explorado la posibilidad de considerar mecanismos epigenéticos como reguladores de la expresión fenotípica en estos pacientes y no solo la dosis génica de aquellos genes que escapan a la inactivación del X (D'Aurora et al., 2017; Boeg Winge et al., 2018).

Mecanismos epigenéticos: miRNAs

La epigenética se ha definido como los cambios hereditarios en la expresión génica que alteran los fenotipos sin cambiar los genotipos (Egger et al., 2004). La regulación epigenética es crítica para las funciones celulares y determina el potencial de diferenciación de las células madre y las células progenitoras (Egger et al., 2004; Cedar & Bergman, 2009). Los diferentes mecanismos que contribuyen al establecimiento y la reorganización del epigenoma incluyen mediadores de metilación de DNA, moduladores de cromatina y pequeños RNA no codificantes (miRNAs) (Tseng et al., 2015).

La espermatogénesis es un proceso estrictamente regulado, por la transcripción y el nivel postranscripcional, que permite la producción de gametos continua durante la edad adulta. El mecanismo de control postranscripcional mediado por miRNAs ha surgido últimamente como un importante regulador del espermatogénesis (Khazaie & Nasr Esfahani, 2014; Tseng et al., 2015).

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificante de cadena sencilla de aproximadamente 22 nucleótidos que se producen fisiológicamente en las células eucariotas (Lagos-Quintana et al., 2001). Hoy en día, sabemos que los miRNAs se expresan en casi todos los eucariotas y que incluso varios virus codifican miRNAs. “Esto destaca el poder regulador de éstos, porque los virus no pueden permitirse perder el valioso espacio en sus genomas limitados”, discute Treiber, et al. en una reciente revisión sobre la biogénesis y función de los MiRNAs (Treiber et al., 2019). Después de ser expresado en el núcleo, los miRNAs juegan un papel en la regulación de la expresión génica generalmente llevando al silenciamiento de genes a través de la degradación del RNA mensajero (mRNA) objetivo o al interferir con su traducción. (Figura 4). Mientras que la mayoría de los miRNAs están ubicados dentro de la célula, algunos miRNAs, comúnmente conocidos como miRNAs

circulantes o miRNAs extracelulares, también se han encontrado en el entorno extracelular, incluidos diversos fluidos biológicos y medios de cultivo celular (Treiber et al., 2019).

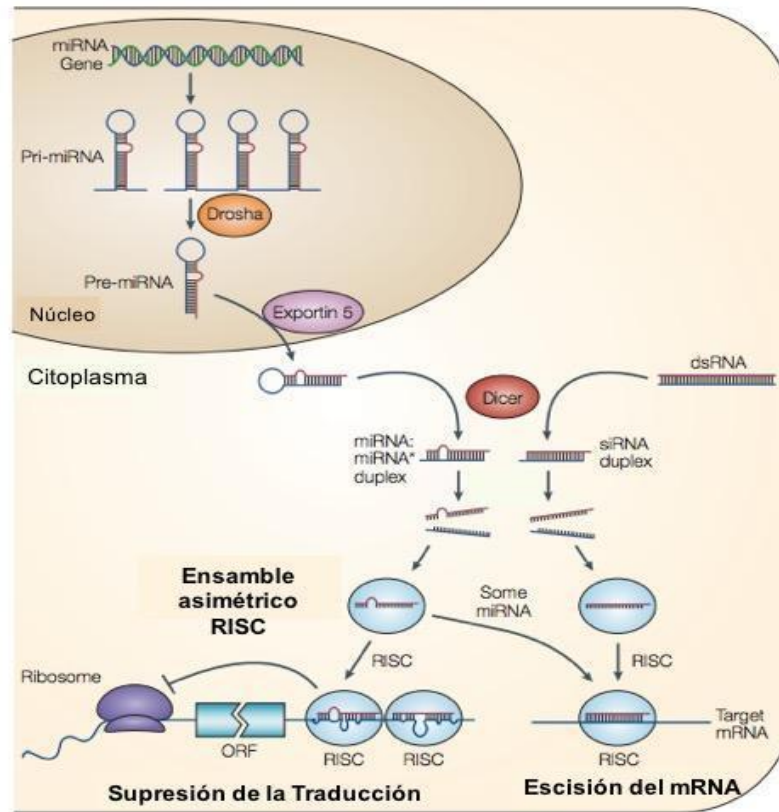


Figura 4. Biogénesis y la supresión post-transcripcional de miRNAs y pequeños RNAs de interferencia (siRNAs). Los transcritos de pri-miRNAs nacientes se procesan primero en pre-miRNA de aproximadamente 70 nucleótidos por Drosha dentro del núcleo. Pre-miRNAs se transportan al citoplasma por Exportina 5 y se procesan en dúplex miRNA por Dicer. Dicer también procesa moléculas dsRNA largas en pequeños dúplex siRNA. Solo una cadena del dúplex miRNA o el dúplex siRNA se ensambla preferentemente en el complejo silenciador inducido por RNA (RISC), que posteriormente actúa sobre su objetivo mediante represión de la traducción o escisión del mRNA, dependiendo, del nivel de complementariedad entre el pequeño RNA y su objetivo. Tomado de He & Hannon, 2004.

Codificado por el DNA nuclear eucariótico en plantas y animales y por el DNA viral en ciertos virus cuyo genoma se basa en el DNA, los miRNAs funcionan a través del emparejamiento de bases con secuencias complementarias dentro de las moléculas de RNAm (Treiber et al., 2019). Como resultado, estas moléculas de RNAm se silencian, mediante uno o más de los siguientes procesos: (a) división de la cadena de RNAm en dos

partes, **(b)** Desestabilización del RNAm mediante el acortamiento de su cola de poli (A), y **(c)** Traducción menos eficiente del RNAm en proteínas por los ribosomas (He & Hannon, 2004; Carthew & Sontheimer, 2009). Los miRNAs se asemejan a los pequeños RNA interferentes (siRNA) de la vía de interferencia de RNA (RNAi), excepto que los miRNAs derivan de regiones de transcripciones de RNA que se doblan sobre sí mismas para formar horquillas cortas, mientras que los siRNA se derivan de regiones más largas de RNA bicatenario (He & Hannon, 2004). El genoma humano puede codificar más de 1000 miRNAs, que son abundantes en muchos tipos de células de mamíferos y parecen apuntar a aproximadamente el 60% de los genes de los humanos y otros mamíferos (Treiber et al., 2019).

Los miRNAs de las plantas generalmente tienen un emparejamiento casi perfecto con sus objetivos de RNAm, lo que induce la represión de genes a través de la división de los transcritos de destino. En contraste, los miRNAs animales pueden reconocer sus RNAm objetivo usando tan solo 6-8 nucleótidos en el extremo 5' del miRNA, que no es suficiente para inducir la ruptura de los RNAm diana (He & Hannon, 2004). El primer miRNA fue descubierto a principios de la década de 1990. Sin embargo, los miRNAs no fueron reconocidos como una clase distinta de reguladores biológicos hasta principios de la década de 2000 (Lagos-Quintana et al., 2001). La investigación de miRNA reveló diferentes conjuntos de miRNAs expresados en diferentes tipos de células y tejidos con múltiples funciones en el desarrollo de muchos procesos biológicos. La expresión aberrante de miRNAs está implicada en los estados de enfermedad (Treiber et al., 2019).

Normalmente el silenciamiento transcripcional de los genes en los cromosomas X e Y se produce a mediados o finales de paquiteno, sin embargo, la mayoría de los genes de miRNAs localizados en el cromosoma X son transcritos y procesados en esta etapa (Turner,

2007). Song et al. informó que alrededor del 86% de los miRNAs localizados en el cromosoma X en realidad escapan de la inactivación meiótica del cromosoma sexual durante la espermatogénesis (Song et al., 2009). Este hallazgo sugiere que o bien se involucran en este proceso de inactivación o que son esenciales para el control postranscripcional de los RNAm autosómicos durante la meiosis (Song et al., 2009). Lo anteriormente descrito puede ser el mecanismo que quizás sea afectado al tener un cromosoma X extra y explique las consecuencias en la espermatogénesis de los pacientes con SK. El análisis de perfiles de expresión de miRNAs en tejido testicular de pacientes masculinos con infertilidad ya ha sido publicado por diversos autores (Abu-Halima, Backes, et al., 2014; Salas Huetos, et al., 2015).

El primer informe de una alteración de la expresión de miRNA en el testículo de pacientes con azoospermia no obstructiva fue publicado por Lian et al. que comunicó una disminución en la expresión de 154 miRNAs y una franca elevación en la expresión de 19 miRNA (Lian et al., 2009). Wu et al. evaluaron el patrón de expresión del miR-i9B y let-7a en individuos con infertilidad idiopática por RT-PCR cuantitativa. Estos autores mostraron que estos dos miRNAs expresaron claramente niveles más altos en los casos de pacientes infértiles en comparación con los individuos fértiles (Wu et al., 2012).

Abu-Halima et al. proponen un perfil de 5 miRNAs (hsa-miR-34b*, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-429, and hsa-miR-122) como potenciales biomarcadores ya que muestra un patrón de expresión distinto en los pacientes con infertilidad y el tejido testicular normal (Abu-Halima, Hammadeh, et al., 2014).

Liu et al. describieron el perfil de expresión de miRNAs expresado en las espermatogonias, los espermátocitos en paquíteno y las espermátidas redondas. Las micromatrices de miRNAs mostraron distintos perfiles globales entre espermatogonias humanas, espermátocitos en paquíteno y espermátidas redondas. Treinta y dos miRNAs estaban significativamente regulados al alza, mientras que 78 miRNAs estaban regulados a

la baja entre las espermatogonias humanas y los espermatoцитos en paquiteno, lo que sugiere que estos miRNA están involucrados en la meiosis y la mitosis, respectivamente. En total, 144 miRNAs fueron significativamente regulados al alza mientras que 29 miRNAs fueron regulados a la baja entre los espermatoцитos en paquiteno y espermátidas redondas, lo que refleja los roles potenciales de estos miRNAs en la mediación de la espermiogénesis (Liu et al., 2015).

Recientemente diversos autores buscan a través del análisis de expresión de miRNAs y transcriptoma en células de pacientes con SK, encontrar los mecanismo y vías implicadas en el desarrollo del fenotipo en los pacientes con síndrome de Klinefelter (Sui et al., 2012; Viana et al., 2014; D'Aurora et al., 2015;) (Cimino et al., 2017).

Los primeros análisis de transcriptoma en células de pacientes con SK son de Viana J, et al. en 2014, determinando el perfil de expresión y análisis de metilación en células de la corteza prefrontal de un paciente con SK y comparándolo con un perfil de un individuo XY y un individuo XX. Este autor publicó la primera caracterización molecular detallada de la corteza prefrontal y el cerebelo de un individuo con un cariotipo 47,XXY, identificando alteraciones epigenómicas y transcriptómicas específicas del tejido generalizadas en el cerebro (Viana et al., 2014), mientras que Huang J, et al. evaluaron los perfiles de expresión en sangre periférica de cinco pacientes con SK y cinco hombres sanos, mediante análisis de microarreglos. Se identificaron 21 genes expresados diferencialmente entre los grupos. Los genes asociados con la regulación del metabolismo y la codificación de la proteína de unión a los ácidos grasos del hígado (FABP1), la aldehído-deshidrogenasa 1 miembro de la familia L1 (ALDH1L1) y la vitronectina (VTN) fueron genes subexpresados, los cuales pudieran estar involucrados en el metabolismo anormal de los pacientes con SK (J. Huang et al., 2015).

Posteriormente D'Aurora M, et al. aportaron los datos del perfil de expresión en células de tejido testicular de pacientes con SK, en el 2015 realizaron un análisis de

transcriptoma en biopsias de testículos obtenidas de 6 pacientes con SK sin mosaico y azoospermicos y 3 sujetos control. Los pacientes con SK mostraron la expresión aumentada de 656 transcritos y 247 transcritos con disminución de la expresión. La gran mayoría de los transcritos desregulados fueron expresados por células de Sertoli y células de Leydig. El análisis funcional indicó cambios en los genes implicados en la muerte celular, la respuesta inflamatoria, el metabolismo de los lípidos, la esteroidogénesis, la formación y el mantenimiento de la barrera testicular en la sangre, así como el fracaso del espermatogénesis (D'Aurora et al., 2015). Se realizó un análisis de transcriptoma en biopsias de testículo obtenidas de tres pacientes con SK con hipoespermatogénesis y tres sujetos control. Los resultados mostraron una regulación ascendente y descendente diferencial de 303 y 747 transcritos, respectivamente, en comparación con los controles. La mayoría de los transcritos con disminución en la expresión estaban involucrados en el fracaso de la espermatogénesis y defectos morfológicos de los testículos, mientras que los genes que mostraron un aumento en la transcripción estaban involucrados en procesos apoptóticos del tejido testicular. Los análisis funcionales de los genes alterados se expresan en vías asociadas a la muerte celular, la función y morfología de las células germinales, así como el mantenimiento de la barrera hemato-testicular y la actividad de las células de Leydig. Estos datos apoyan un escenario complejo en el que la alteración en la espermatogénesis está mediada quizás por aspectos genéticos y epigenéticos (D'Aurora et al., 2017).

Otro grupo que ha realizado estudios de expresión en pacientes con SK son Winge SB, et al. quienes han publicado dos trabajos que señalan, a través del análisis de 8 testículos de fetos con SK, una marcada reducción en las pre-espermatogonias positivas para *MAGE-A4* en testículos de pacientes con SK en comparación con las de los testículos de 15 controles apareados por edad, lo que indica un fracaso de los gonocitos para diferenciarse a pre-espermatogonias. El análisis del transcriptoma mediante la secuenciación de RNA del tejido

de los testículos fijados con formalina e incluidos en parafina y de cuatro fetos con SK y cinco controles emparejados por edad, reveló 211 transcripciones expresadas diferencialmente en el testículo fetal, además de un enriquecimiento de RNA largos no codificantes en los testículos de pacientes con SK (LINC01569 y RP11-485F13) (D'Aurora et al., 2017; Sofia Boeg Winge et al., 2018). Estos mismos autores posteriormente realizaron la secuenciación del RNA de 24 muestras tejido testicular incluidos en parafina comparada con tejidos de individuos 46,XX y compararon con testículos que mostraron un patrón de solo células de Sertoli. El análisis de los transcriptomas reveló 235 transcripciones expresadas diferencialmente en los testículos de SK adultos, con un enriquecimiento de los RNA largos no codificantes, aunque curiosamente no se observó sobreexpresión de genes localizados en el cromosoma X. Sin embargo, los cambios de los transcriptomas de testículo fetal, pre-puberal y adulto de varones con SK mostraron una superposición limitada, lo que indica que es probable que diferentes mecanismos operen en cada etapa del desarrollo. Estos autores proponen que la degeneración testicular en hombres con SK es una consecuencia de la pérdida de células germinales iniciada durante el desarrollo temprano en combinación con la maduración alterada de células de Sertoli y de Leydig (Boeg Winge et al., 2018).

Todos estos datos muestran cómo los efectos en la expresión de múltiples vías se expresan de forma diferencial en el paciente con SK, siendo sin duda los mecanismos epigenéticos los que juegan un importante papel en la expresividad del fenotipo de los pacientes con SK. Hasta hoy son pocas las publicaciones que evalúan el papel de la función de los miRNAs en el desarrollo de la degeneración de las células germinales en los pacientes con SK. El estudio de Sui W, et al. en 2012 evalúa la relación entre el perfil de la expresión de miRNAs y el fenotipo de varones con SK. Estos autores realizaron un análisis de secuenciación de nueva generación de miRNAs, de células mononucleares de sangre

periférica, en 7 individuos con SK y 7 sujetos 46,XY. En comparación con los controles sanos, observaron una expresión aumentada en 71 miRNAs y 18 miRNAs mostraron niveles de expresión reducidos en el grupo de pacientes con SK, además identificaron nuevos miRNAs, los cuales estaban expresados de manera diferencial. Sin embargo, las limitaciones de este estudio son el reducido número de pacientes y el tipo de tejido analizado (Sui et al., 2012).

Un estudio muy interesante publicado por Werler S, et al. en 2014, utilizando el modelo de ratón 41, XXY, propuso que la expresión disminuida de Lin 28A y los miRNAs que lo regulan, pudiera explicar la disminución de las células germinales desde el desarrollo fetal (Sui et al., 2012; Werler et al., 2014). Lin28A es un marcador específico de las espermatogonias, que se ha demostrado que no solo es esencial para el desarrollo exitoso de células germinales primordiales, sino que también marca la espermatogonía indiferenciada en ratones a lo largo de su vida (Zheng et al., 2009). Estos autores comunicaron una expresión diferencial Lin28A y los miRNAs que lo regulan, desde el periodo fetal de los ratones. Al final los autores concluyen y postulan un modelo que da como resultado una pérdida de células germinales debido a la alteración en el desarrollo correcto de los gonocitos durante el período embrionario y fetal, que no solo resulta en un menor número de células germinales al nacer, sino también en la desestabilización de las características de las células madre, reflejada por la pérdida de la expresión de los marcadores específicos y por último las células germinales que logran sobrevivir finalmente se pierden cuando los procesos de diferenciación meiótica presentan los problemas que conlleva el estado aneuploide de las células.

Hasta nuestra revisión, el último estudio de análisis de miRNAs fue publicado por Cimino L, et al. quienes realizaron un análisis de expresión de miRNAs en células mononucleares obtenidas de muestras de sangre de 10 pacientes con SK, 10 controles 46,

XY y 10 controles 46,XX. El análisis de expresión fue a través de secuenciación de nueva generación. Este estudio reveló una expresión diferencial significativa en 73 miRNAs, particularmente miR-3648 y miR-3687.

El análisis funcional de las transcripciones desreguladas sugiere que estos miRNAs, pueden jugar un papel en los mecanismos moleculares implicados en la degeneración de las células germinales, los trastornos neurológicos y el riesgo de desarrollo de cáncer y obesidad que ocurren con mayor frecuencia en pacientes con SK, sin embargo, estos resultados deben considerarse preliminares ya que la expresión génica se midió en células sanguíneas (Cimino et al., 2017).

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

El síndrome de Klinefelter es la cromosomopatía más frecuente en el varón y también la causa más común de azoospermia de origen genético. A la fecha no está claro el mecanismo molecular que desencadena la degeneración de las células germinales masculinas. El papel de los miRNAs como reguladores activos de la espermatogénesis ha sido descrito, sin embargo no existen estudios de análisis de expresión de miRNAs en tejido testicular de pacientes con SK, por lo que, evaluar el perfil de expresión en tejido testicular en los pacientes con SK, puede generar información relevante que permitiría entender mejor el desarrollo de la degeneración de las células germinales y el proceso que desencadena la infertilidad en estos individuos, además de identificar otros mecanismos epigenéticos que se han venido proponiendo recientemente.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

El perfil de expresión de miRNAs en tejido testicular de pacientes con Síndrome de Klinefelter es diferente al de los individuos con fórmula cromosómica normal particularmente en genes diana, relacionados con la degeneración de las células germinales y otros cambios en el tejido testicular.

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el perfil de expresión en tejido testicular en los pacientes con SK y analizar su papel en el desarrollo de la degeneración de las células germinales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

PRIMERO. Determinar el perfil de expresión de miRNAs en tejido testicular de pacientes con Síndrome de Klinefelter.

SEGUNDO. Determinar el perfil de expresión de miRNAs en tejido testicular con espermatogénesis completa correspondientes al grupo control de pacientes con azoospermia obstructiva.

TERCERO. Comparar ambos perfiles de expresión.

CUARTO. Identificar miRNAs con expresión diferencial en ambos grupos y los genes diana con que interactúan.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio:

Es un estudio comparativo, descriptivo, transversal, de casos y controles, para evaluar el perfil de expresión de miRNAs en tejido testicular de pacientes con Síndrome de Klinefelter y compararlo con tejido testicular normal.

Criterios de inclusión:

Casos: Muestra de tejido testicular humano, con diagnóstico citogenético de SK, embebido en bloques de parafina.

Controles: Muestras de tejido testicular humano con azoospermia obstructiva que tengan informe histológico de tejido testicular normal.

Muestras que hayan sido donados para investigación en líneas de infertilidad.

Criterios de exclusión

Tejido testicular con hialinización de más del 90% del tejido testicular.

No contar con confirmación citogenética del diagnóstico de SK.

Criterios de eliminación

Muestra de RNA total con calidad y cantidad no óptima para el proceso.

Obtención de muestras

Se analizará las muestras procedentes del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz, de tejido testicular incluido en parafina obtenido por biopsia en pacientes con diagnóstico de SK.

Para el grupo control se utilizarán muestras de dicho archivo, que cuenta con tejido procedente de biopsias realizadas a pacientes con infertilidad que fueron diagnosticados con azoospermia obstructiva por lo cual el tejido testicular se encuentra preservado. Se estableció el análisis de 7 muestras en el grupo de pacientes con SK y 5 muestras del grupo control. Las

muestras procedentes de bloques embebidos en parafina, serán cortadas con micrótopo, realizándose 5-10 cortes de 15 micras y colocados en tubos Eppendorf, sellados con parafina y etiquetados con solo una clave numérica para su clasificación por tipo histológico y qué grupo pertenece.

Extracción de RNA total

La extracción de RNA total se realizó utilizando mirVana™ miRNA isolation kit (Life Technologies, Grand Island, NY) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La concentración y la pureza de las muestras de RNA se determinaron con el espectrofotómetro Nanodrop y la calidad fue verificada con el equipo Bioanalyzer, Agilent 2100. Para considerar aceptable la muestra debió contener al menos 50 nanogramos de RNA total con una pureza mínima de 1.80 de absorbancia en una relación de longitudes de onda de entre 260/280 nm.

Análisis de las muestras.

Construcción de la biblioteca y análisis de secuenciación.

Se utilizaron aproximadamente 1 µg de RNA total para preparar una pequeña librería de RNA de acuerdo con el protocolo de los kits de preparación de muestras de RNA pequeño TruSeq (Illumina, San Diego, EE. UU.) tal como se refleja en la Figura 5. Posteriormente se realizó la secuenciación de un solo extremo 50 pb en una Illumina Hiseq 2500 siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor.

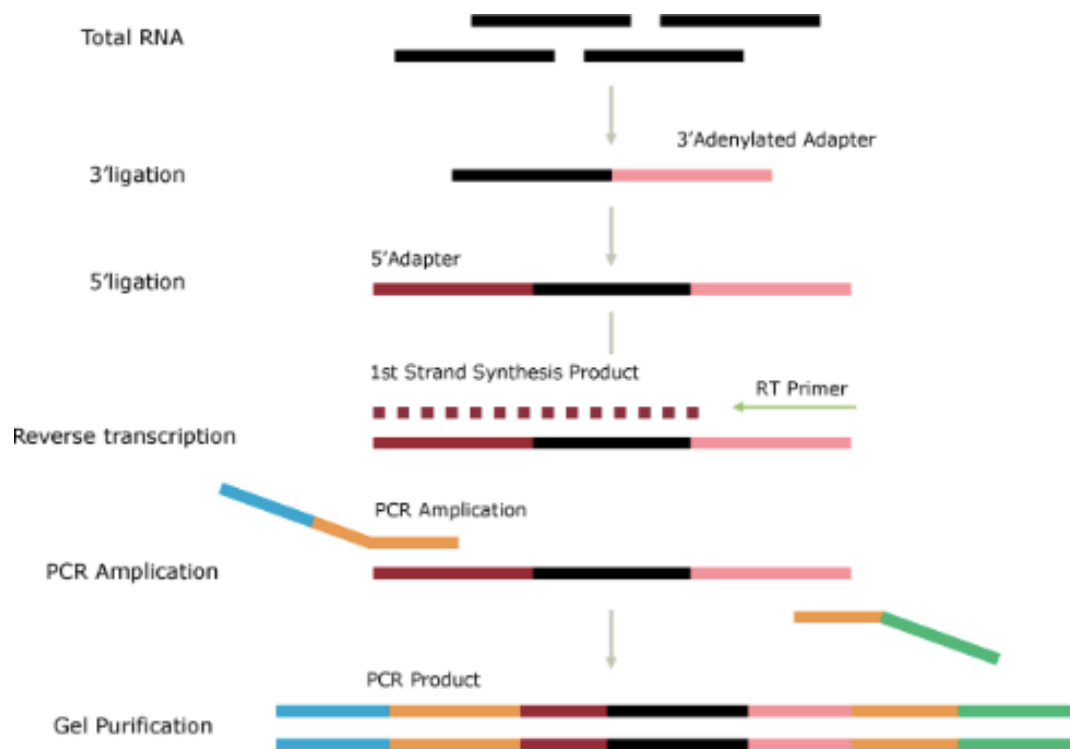


Figura 5. Flujo de pasos para la construcción de la biblioteca.

Análisis bioinformático.

Las lecturas sin procesar se sometieron a un programa interno, ACGT101-miR (LC Sciences, Houston, Texas, EE. UU.) Para eliminar dímeros adaptadores, basura, baja complejidad, familias de RNA comunes (RNAr, RNAt, RNAsn, RNAsn) y repeticiones. Posteriormente, las secuencias únicas con longitud en 18 ~ 26 nucleótidos se asignaron a precursores de especies específicas en miRBase 22.0 mediante la búsqueda de BLAST para identificar miRNAs conocidos y los nuevos miRNA derivados de 3p y 5p. La variación de longitud en los extremos 3' y 5' y un desajuste dentro de la secuencia se permitieron en la alineación. Las secuencias únicas que mapean a miRNAs maduras de especies específicas en brazos de horquilla se identificaron como miRNAs conocidos. Las secuencias únicas que mapean en el otro brazo de horquilla precursora de especies específicas conocidas opuestas al brazo que contiene miRNA maduro anotado se consideraron candidatos de miRNA derivados de 5p o 3p nuevos. Las secuencias restantes se mapearon en

otras precursoras de especies seleccionadas (con la exclusión de especies específicas) en miRBase 22.0 mediante la búsqueda de BLAST, y los pre-miRNAs mapeados se tomaron de BLAST contra los genomas de especies específicas para determinar sus ubicaciones genómicas. Los dos anteriores los definimos como miRNAs conocidos. Las secuencias no asignadas se tomaron en BLAST contra los genomas específicos, y las estructuras de ARN de horquilla que contenían secuencias se predicaron a partir de las secuencias de 80 nt del flanco utilizando el software RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

Los criterios para la predicción de la estructura secundaria fueron: (1) número de nucleótidos en una protuberancia en el tallo (≤ 12) (2) número de pares de bases en la región del tallo de la horquilla predicha (≥ 16) (3) corte de energía libre ($\text{kCal} / \text{mol} \leq -15$) (4) longitud de la horquilla (tallos arriba y abajo + bucle terminal ≥ 50) (5) longitud de la horquilla (≤ 20). (6) número de nucleótidos en una protuberancia en la región madura (≤ 8) (7) número de errores sesgados en una protuberancia en la región madura (≤ 4) (8) número de protuberancias sesgadas en la región madura (≤ 2) (9) número de errores en la región madura (≤ 7) (10) número de pares de bases en la región madura de la horquilla predicha (≥ 12) (11) por ciento de madurez en el tallo (≥ 80).

Descripción general de las lecturas de datos crudos (rawdata) a datos filtrados (cleandata)

Los datos sin procesar se filtraron utilizando un módulo de filtro en un programa interno ACGT101-miR para eliminar lecturas de baja calidad, secuencias adaptadoras 3' y contaminaciones. Las secuencias de datos limpios de ≥ 18 nucleótidos se anotaron en la base de datos de Rfam (<http://www.sanger.ac.uk/software/Rfam>) para eliminar el RNA no

codificante (rRNA, tRNA, pnRNA, nsRNA, snRNA, snoRNA) y fragmentos de degradación de RNAm. Las secuencias restantes se alinearon con la base de datos de miRNA, miRbase (Release 21) (<http://www.miRbase.org/>) y las secuencias perfectamente emparejadas se consideraron como miRNA conservados de *Homo sapiens*. El algoritmo para el análisis bioinformático de los datos se presenta en la Figura 6.

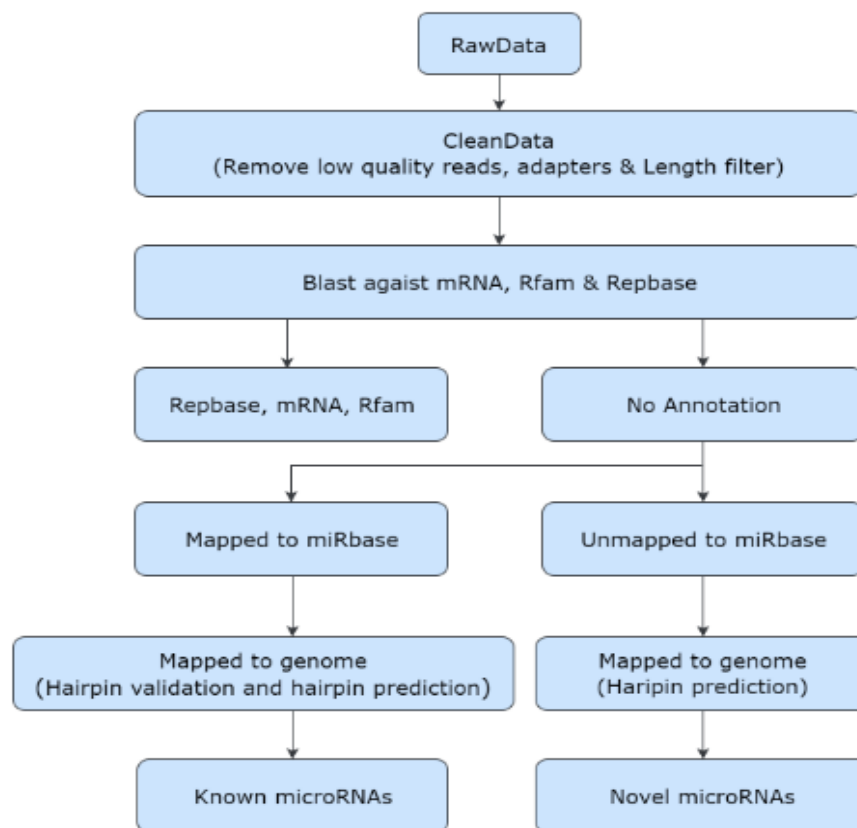


Figura 6. Algoritmo para el análisis bioinformático de los datos.

Una vez procesadas por el módulo de filtro en ACGT101-miR, se analizaron lecturas únicas utilizando ACGT101-miR para detectar miRNAs conservados y nuevos de *Homo sapiens*. Esas lecturas únicas que se asignaron a miRNAs / pre-miRNAs de especies específicas en miRbase y los pre-miRNAs se mapearon en el genoma.

La normalización del conteo de cada secuencia por muestra (o conjunto de datos) se logra dividiendo los recuentos por un parámetro de tamaño de librería de la muestra correspondiente. El parámetro de tamaño de la librería es un valor medio de la relación entre los recuentos de una muestra específica y una muestra de referencia. El número de recuento en la muestra de referencia es la media geométrica de recuento en todas las muestras. S_j es el tamaño de la librería; c_{ij} es el número de recuento de la secuencia i de la muestra j ; m es el número total de muestras involucradas.

$$s_j = \underset{i}{median} \left(\frac{c_{ij}}{\left(\prod_{k=1}^m c_{ik} \right)^{1/m}} \right)$$

Análisis estadístico

La expresión diferencial de miRNAs en función del conteo de secuencias normalizadas se analizó mediante el uso selectivo de las pruebas t de Student. El umbral de significancia se estableció en <0.05 para cada prueba. Se utilizaron muestras pareadas de 3 pacientes (KLI_1 a KLI_6) para aumentar la reproducibilidad. El paciente número 4 tenía solo una muestra de biopsia y, por lo tanto, no había muestras procedentes de ambos testículos y esta muestra única se incluyó para aumentar la fuerza estadística de nuestro estudio.

miRNAs - predicción de objetivos y redes de interacción

Llevamos a cabo dos análisis de interacción separados de los miRNAs diferencialmente expresados (sobreexpresados o infraexpresados) y que mostraron un nivel de expresión aumentado usando la plataforma de base de datos miRNet (Fan & Xia, 2018).

Esta base de datos integra la información de 11 bases de datos de miRNA diferentes: TarBase, miRTarBase, miRecords, miRanda, miR2Disease, HMDD, PhenomiR, SM2miR, Pharmaco-miR, EpimiR y StarBase. La predicción del objetivo de miRNA fue seguida por un análisis de la red de interacción y un enriquecimiento de los términos GO para procesos biológicos relacionados con la diferenciación sexual, la reproducción sexual masculina, la diferenciación y desarrollo celular.

Los genes objetivo predichos por miRNA se visualizaron con el software Cytoscape (<http://cytoscape.org/>) (Saito et al., 2012; Fan & Xia, 2018). Cytoscape es un paquete de software de código abierto que permite mapeos visuales potentes de los conjuntos de datos proporcionados.

Los genes diana obtenidos se analizaron mediante el análisis estadístico de sobrerrepresentación (Statistical overrepresentation test) utilizando la plataforma PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) (Mi et al., 2019). Para el cálculo de la prueba de sobrerrepresentación (Statistical overrepresentation test), el valor "esperado" es el número de genes que se espera participen en los procesos biológicos GO sin diferencias estadísticas de manera similar a un grupo de genes seleccionados de forma aleatoria de una lista predeterminada por el sistema. Si existe un número mayor al esperado de genes en la lista de genes diana participante en los procesos biológicos, que muestre diferencias significativamente estadísticas de acuerdo a un valor de $p < 0.05$ obtenido mediante la prueba de Fisher, nos permite establecer un peso mayor a la participación de los genes diana en los procesos biológicos de interés o si estos no tienen una participación relevante en esos procesos biológicos.

RESULTADOS

RESULTADOS

Se analizaron 7 muestras de tejido testicular de 4 pacientes con síndrome de Klinefelter y 5 muestras de tejido testicular de pacientes con azoospermia obstructiva como grupo control.

Las muestras KLI_1 y KLI_2 proceden de cada uno de los testículos del mismo paciente masculino de 36 años de edad, con diagnóstico de Síndrome de Klinefelter, que mostraba túbulos hialinizados y patrón principalmente de solo células de Sertoli con espermatogénesis muy aislada.

Las muestras KLI_3 y KLI_4 corresponden cada una a diferente testículo del mismo paciente de 35 años, KLI_3 tiene 1% tubos con espermatogénesis y KLI_4 un 5% tubos con espermatogénesis.

Las muestras KLI_5 y KLI_6 pertenecen a un individuo de 33 años con una fórmula en mosaico 47,XXY/46,XY, que muestra una histología similar de alto porcentaje de túbulos hialinizados y con patrón de solo células de Sertoli.

La muestra KLI_7 pertenece a otro individuo con características histológicas similares al caso previamente descrito de 36 años de edad al momento de la biopsia. Las características a histopatológicas se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Características Histopatológicas de las muestras de los pacientes con SK.

Paciente	Edad	Muestras	% de túbulos seminíferos con espermatogénesis	% con patrón de solo células de Sertoli	% de Túbulos seminíferos hialinizados
1	36	KLI_1	1%	9%	90%
		KLI_2	1%	9%	90%
2	35	KLI_3	1%	9%	90%
		KLI_4	5%	5%	90%
3	33	KLI_5	1%	9%	90%
		KLI_6	1%	9%	90%
4	36	KLI_7	5%	20%	75%

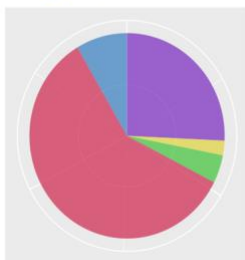
Las muestras del grupo control de pacientes con azoospermia obstructiva mostraban tubos seminíferos con cambios obstructivos tales como ectasia tubular, aserramiento del epitelio seminífero, vacuolización de las células de Sertoli, y espermatogénesis completa.

Análisis de expresión de miRNAs

Los datos sin procesar se filtraron utilizando un módulo de filtro en un programa interno ACGT101-miR para eliminar lecturas de baja calidad, secuencias adaptadoras 3' y contaminaciones. Las secuencias de datos limpios de ≥ 18 nucleótidos se anotaron en la base de datos de Rfam (<http://www.sanger.ac.uk/software/Rfam>) para eliminar el RNA no codificante (rRNA, tRNA^t, pRNA, nsRNA, snRNA, snoRNA) y fragmentos de degradación de RNAm. Las secuencias restantes se alinearon con la base de datos de miRNA, miRbase (Release 21) (<http://www.miRbase.org/>) y las secuencias perfectamente emparejadas se consideraron como miRNAs conservados de *Homo sapiens*. La distribución de los diferentes RNAs en cada una de las muestras se presenta en las figuras 7A y 7B.

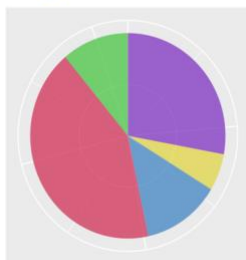
Pie chart for Rfam KLI_1 (Total)

rRNA (876629 [59.02%])
 tRNA (382505 [25.75%])
 others (126074 [8.49%])
 snoRNA (66065 [4.45%])
 snRNA (34093 [2.30%])



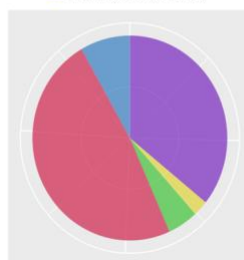
Pie chart for Rfam KLI_1 (Unique)

rRNA (35718 [42.27%])
 tRNA (23572 [27.89%])
 snoRNA (10928 [12.93%])
 others (9361 [11.08%])
 snRNA (4929 [5.83%])



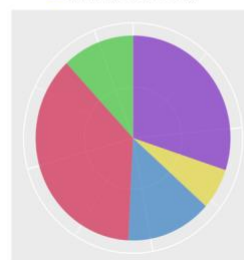
Pie chart for Rfam KLI_2 (Total)

rRNA (954798 [48.40%])
 tRNA (706422 [35.81%])
 others (162950 [8.26%])
 snoRNA (99440 [5.04%])
 snRNA (49114 [2.49%])



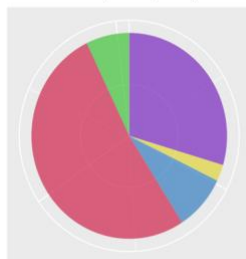
Pie chart for Rfam KLI_2 (Unique)

rRNA (39549 [37.26%])
 tRNA (31919 [30.07%])
 snoRNA (15079 [14.21%])
 others (12699 [11.96%])
 snRNA (6901 [6.50%])



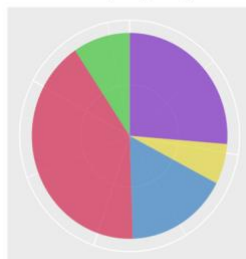
Pie chart for Rfam KLI_3 (Total)

rRNA (794316 [51.93%])
 tRNA (452452 [29.58%])
 snoRNA (133668 [8.74%])
 others (109404 [7.15%])
 snRNA (39798 [2.60%])



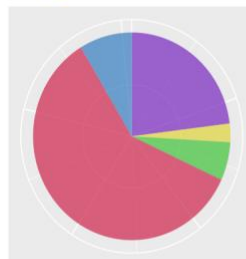
Pie chart for Rfam KLI_3 (Unique)

rRNA (37167 [41.10%])
 tRNA (23769 [26.28%])
 snoRNA (15260 [16.87%])
 others (8511 [9.41%])
 snRNA (5727 [6.33%])



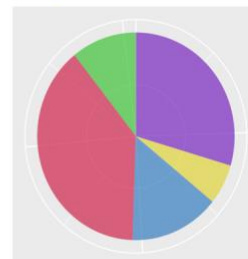
Pie chart for Rfam KLI_4 (Total)

rRNA (755060 [59.48%])
 tRNA (292256 [23.02%])
 others (109459 [8.62%])
 snoRNA (75847 [5.97%])
 snRNA (36808 [2.90%])



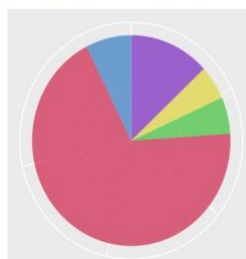
Pie chart for Rfam KLI_4 (Unique)

rRNA (31628 [38.76%])
 tRNA (24121 [29.56%])
 snoRNA (12004 [14.71%])
 others (8721 [10.69%])
 snRNA (5129 [6.29%])



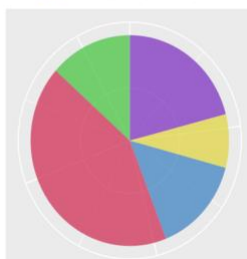
Pie chart for Rfam KLI_5 (Total)

rRNA (959441 [68.59%])
 tRNA (182919 [13.08%])
 others (104157 [7.45%])
 snoRNA (78781 [5.63%])
 snRNA (73599 [5.26%])



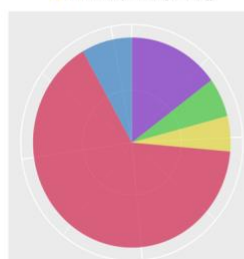
Pie chart for Rfam KLI_5 (Unique)

rRNA (36902 [42.51%])
 tRNA (18191 [20.95%])
 snoRNA (12933 [14.90%])
 others (11661 [13.43%])
 snRNA (7126 [8.21%])



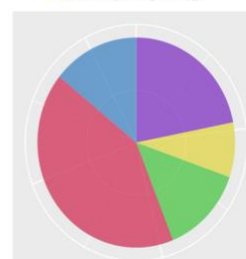
Pie chart for Rfam KLI_6 (Total)

rRNA (809105 [65.40%])
 tRNA (183993 [14.87%])
 others (101887 [8.24%])
 snoRNA (74973 [6.06%])
 snRNA (67279 [5.44%])



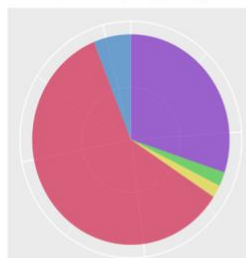
Pie chart for Rfam KLI_6 (Unique)

rRNA (36256 [41.86%])
 tRNA (18976 [21.91%])
 others (12295 [14.20%])
 snoRNA (11785 [13.61%])
 snRNA (7303 [8.43%])



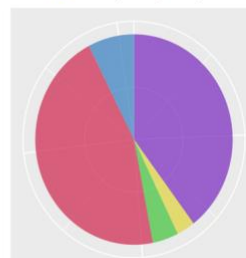
Pie chart for Rfam KLI_7 (Total)

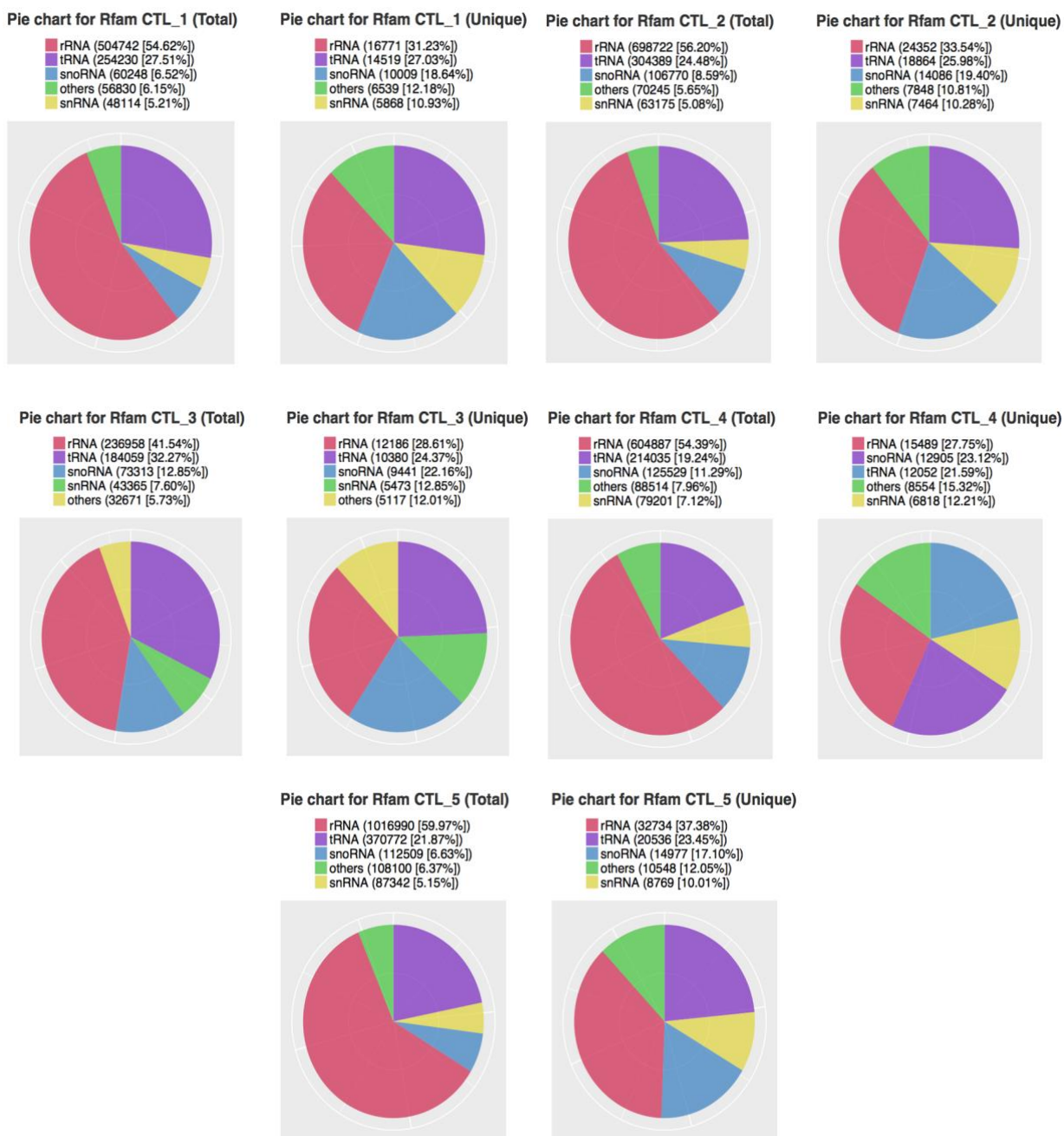
rRNA (124467 [59.70%])
 tRNA (62699 [30.07%])
 others (12757 [6.12%])
 snoRNA (4547 [2.18%])
 snRNA (4023 [1.93%])



Pie chart for Rfam KLI_7 (Unique)

rRNA (18664 [45.51%])
 tRNA (16275 [39.69%])
 others (3099 [7.56%])
 snoRNA (1741 [4.25%])
 snRNA (1231 [3.00%])





7B

Figura 7A y 7B. Distribución de los diferentes tipos de RNAs en las diferentes muestras de pacientes con Síndrome de Klinefelter (A) y grupo control (B).

Un total de 3.898 secuencias diferentes de miRNAs fueron identificados en las muestras de ambos grupos, 2.479 secuencias reportadas en miRBase y 1.419 no reportadas en miRBase. Un total de 1.598 miRNAs fueron identificados en este estudio. El loci reportado de los miRNAs identificados se muestra en la Figura 8.

De los miRNAs identificados, 201 mostraban un nivel de expresión alto y 168 eran secuencias reportadas en miRBase y 33 secuencias novel. Se estableció como un nivel expresión alta a un número de lecturas mayor al promedio del conjunto de datos. La lista de los miRNAs con nivel de expresión alto y que estaban en miRBase se muestra en la Tabla 5. De estos miRNAs se puede observar que 33 tiene su loci en el cromosoma X como se expresa en la Figura 9.

Mil noventa y cinco miRNAs tuvieron una expresión media que se definió como aquellos en que el número de lecturas era mayor que 10 y menor que la copia promedio del conjunto de datos, mientras que 551 miRNAs tuvieron un nivel de expresión bajo definido como aquellos en los que el número de lecturas de miRNAs reportados era inferior a 10.

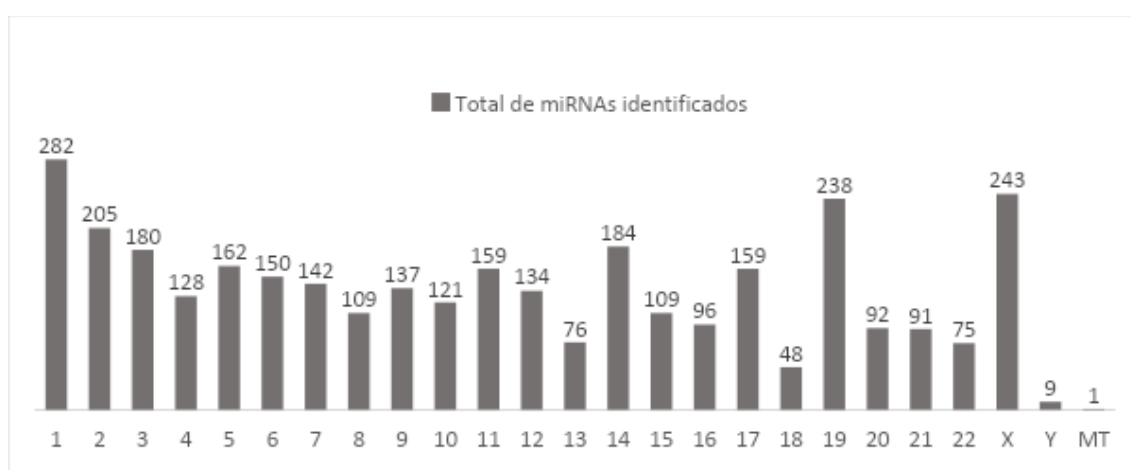


Figura 8. Gráfico de barra que muestra la distribución de los miRNAs identificados en los diferentes cromosomas y DNA mitocondrial (MT).

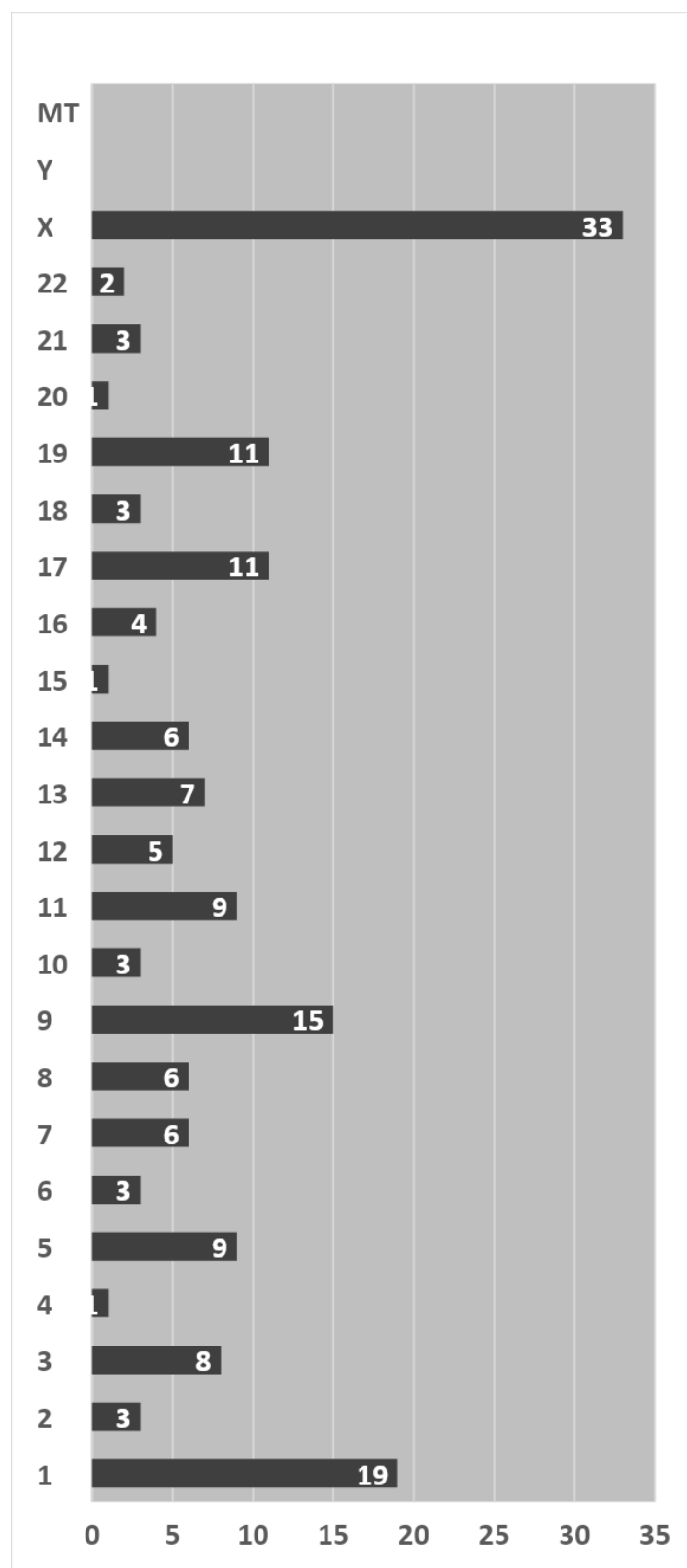


Figura 9. Se muestra la localización reportada de los miRNAs con nivel alto de expresión, en el eje Y se ubica el cromosoma y en el eje X el número de miRNAs que tienen su loci en dicho cromosoma.

Tabla 5. Lista miRNAs con un nivel alto de expresión y con secuencias reportadas en miRBase.

miRNAs	Secuencia	Loci
bta-miR-150	TCTCCCAACCCTTGTACCAGTGT	chr19
cgr-miR-1260	ATCCCACCGCTGCCACCA	chr9
cgr-miR-1260	ATCCCACCGCTGCCACCA	chrX
hsa-let-7a-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	chr22
hsa-let-7a-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	chr9
hsa-let-7a-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	chr11
hsa-let-7b-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT	chr22
hsa-let-7c-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT	chr21
hsa-let-7d-3p	CTATACGACCTGCTGCCTTTCT	chr9
hsa-let-7d-5p	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT	chr9
hsa-let-7e-5p	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT	chr19
hsa-let-7f-5p	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	chr9
hsa-let-7f-5p	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT	chrX
hsa-let-7g-5p	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT	chr3
hsa-let-7i-5p	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT	chr12
hsa-miR-100-5p	AACCCGTAGATCCGAACCTTGT	chr11
hsa-miR-101-3p	TACAGTACTGTGATAACTGAAT	chr1
hsa-miR-101-3p	TACAGTACTGTGATAACTGAAT	chr9
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA	chr20
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA	chr5
hsa-miR-106a-5p	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG	chrX
hsa-miR-10a-5p	TACCCTGTAGATCCGAATTTGT	chr17
hsa-miR-10b-5p	TACCCTGTAGAACCGAATTTGT	chr2
hsa-miR-12136	GAAAAAGTCATGGAGGCCATGGGGTT	chr1
hsa-miR-122-3p	AAACGCCATTATCACACTAAAT	chr18
hsa-miR-122-5p	TGGAGTGTGACAATGGTGTTTGT	chr18
hsa-miR-1247-5p	ACCCGTCCCGTTTCGTCCCCGGA	chr14
hsa-miR-125a-5p	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGT	chr19
hsa-miR-125b-5p	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA	chr21
hsa-miR-125b-5p	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA	chr11
hsa-miR-126-3p	TCGTACCGTGAGTAATAATGC	chr9
hsa-miR-126-5p	CATTATTACTTTTGGTACGCG	chr9
hsa-miR-127-3p	TCGGATCCGTCTGAGCTTGGCT	chr14
hsa-miR-135a-5p	TATGGCTTTTTATTCCTATGTGA	chr3
hsa-miR-135a-5p	TATGGCTTTTTATTCCTATGTGA	chr12
hsa-miR-136-3p	CATCATCGTCTCAAATGAGTCT	chr14
hsa-miR-139-5p	TCTACAGTGCACGTGTCTCCAGT	chr11
hsa-miR-140-3p	ACCACAGGGTAGAACCACGGAC	chr16
hsa-miR-142-3p	GTAGTGTTCCTACTTTATGGA	chr17
hsa-miR-142-5p	CATAAAGTAGAAAGCACTACT	chr17

miRNAs	Secuencia	Loci
hsa-miR-143-3p	TGAGATGAAGCACTGTAGCTCT	chr5
hsa-miR-143-5p	GGTGCAGTGCTGCATCTCTGG	chr5
hsa-miR-144-3p	TACAGTATAGATGATGTACT	chr17
hsa-miR-145-3p	GGATTCCTGGAAATACTGTTCT	chr5
hsa-miR-145-5p	GTCCAGTTTTCCCAGGAATCCCT	chr5
hsa-miR-146a-5p	TGAGAACTGAATTCCATGGGTT	chr5
hsa-miR-146b-5p	TGAGAACTGAATTCCATAGGCTGT	chr10
hsa-miR-148a-3p	TCAGTGCATACAGAACTTTGT	chr7
hsa-miR-148b-3p	TCAGTGCATCACAGAACTTTGT	chr12
hsa-miR-150-5p	TCTCCCAACCCTTGTACCAGTG	chr19
hsa-miR-151a-3p	CTAGACTGAAGCTCCTTGAGG	chr8
hsa-miR-151b	TCGAGGAGCTCACAGTCTAGT	chr8
hsa-miR-152-3p	TCAGTGCATGACAGAACTTGG	chr17
hsa-miR-15a-5p	TAGCAGCACATAATGGTTTGTG	chr13
hsa-miR-15b-5p	TAGCAGCACATCATGGTTTACA	chr3
hsa-miR-16-5p	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG	chr13
hsa-miR-16-5p	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG	chr3
hsa-miR-17-5p	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG	chr13
hsa-miR-181a-5p	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT	chr9
hsa-miR-181a-5p	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT	chr1
hsa-miR-186-5p	CAAAGAATTCTCCTTTTGGGCT	chr1
hsa-miR-191-5p	CAACGGAATCCCAAAAGCAGCT	chr3
hsa-miR-192-5p	CTGACCTATGAATTGACAGCC	chr11
hsa-miR-193b-3p	AACTGGCCCTCAAAGTCCCCT	chr16
hsa-miR-194-5p	TGTAACAGCAACTCCATGTGGA	chr1
hsa-miR-194-5p	TGTAACAGCAACTCCATGTGGA	chr11
hsa-miR-195-5p	TAGCAGCACAGAAATATTGGCA	chr17
hsa-miR-199a-5p	CCCAGTGTTTCAGACTACCTGTTC	chr1
hsa-miR-199a-5p	CCCAGTGTTTCAGACTACCTGTTC	chr19
hsa-miR-199b-3p	ACAGTAGTCTGCACATTGGTT	chr1
hsa-miR-199b-3p	ACAGTAGTCTGCACATTGGTT	chr9
hsa-miR-199b-3p	ACAGTAGTCTGCACATTGGTT	chr19
hsa-miR-199b-5p	CCCAGTGTTTAGACTATCTGTTC	chr9
hsa-miR-19a-3p	TGTGCAAATCTATGCAAAACTGA	chr13
hsa-miR-19b-3p	TGTGCAAATCCATGCAAAACTGA	chrX
hsa-miR-19b-3p	TGTGCAAATCCATGCAAAACTGA	chr13
hsa-miR-200a-3p	TAACACTGTCTGGTAACGATGTT	chr1
hsa-miR-200b-3p	TAATACTGCCTGGTAATGATGAC	chr1
hsa-miR-200c-3p	TAATACTGCCGGGTAATGATGGA	chr12
hsa-miR-202-5p	TTCCTATGCATATACTTCTTT	chr10
hsa-miR-204-5p	TTCCCTTTGTCATCCTATGCCT	chr9

miRNAs	Secuencia	Loci
hsa-miR-20a-5p	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	chr13
hsa-miR-21-5p	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAC	chr17
hsa-miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT	chr1
hsa-miR-22-3p	AAGCTGCCAGTTGAAGAACTGT	chr17
hsa-miR-221-3p	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTT	chrX
hsa-miR-222-3p	AGCTACATCTGGCTACTGGGTCT	chrX
hsa-miR-223-3p	TGTCAGTTTGTCAAATACCCCAT	chrX
hsa-miR-23a-3p	ATCACATTGCCAGGGATTTC	chr19
hsa-miR-23b-3p	ATCACATTGCCAGGGATTACC	chr9
hsa-miR-24-3p	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGT	chr9
hsa-miR-24-3p	TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGT	chr19
hsa-miR-25-3p	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA	chr7
hsa-miR-26a-5p	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	chr3
hsa-miR-26a-5p	TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT	chr12
hsa-miR-26b-5p	TTCAAGTAATCCAGGATAGGTT	chr2
hsa-miR-27a-3p	TTACAGTGGCTAAGTTCCGC	chr19
hsa-miR-27b-3p	TTACAGTGGCTAAGTTCTGC	chr9
hsa-miR-29a-3p	TAGCACCATCTGAAATCGGTT	chr7
hsa-miR-29b-3p	TAGCACCATTTGAAATCAGTGTT	chr7
hsa-miR-29b-3p	TAGCACCATTTGAAATCAGTGTT	chr1
hsa-miR-29c-3p	TAGCACCATTTGAAATCGGTT	chr1
hsa-miR-30a-3p	CTTTCAGTCGGATGTTTGCAGC	chr6
hsa-miR-30a-5p	TGTAAACATCCTCGACTGGAAGCT	chr6
hsa-miR-30b-5p	TGTAAACATCCTACACTCAGCT	chr8
hsa-miR-30c-5p	TGTAAACATCCTACACTCTCAGCT	chr6
hsa-miR-30c-5p	TGTAAACATCCTACACTCTCAGCT	chr1
hsa-miR-30d-5p	TGTAAACATCCCCGACTGGAAGCT	chr8
hsa-miR-30e-3p	CTTTCAGTCGGATGTTTACAGT	chr1
hsa-miR-30e-5p	TGTAAACATCCTTGACTGGAAGCT	chr1
hsa-miR-328-3p	CTGGCCCTCTCTGCCCTTCCGT	chr16
hsa-miR-342-3p	TCTCACACAGAAATCGCACCCGT	chr14
hsa-miR-34a-5p	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTT	chr1
hsa-miR-34b-5p	AGGCAGTGTTCATTAGCTGATTGT	chr11
hsa-miR-34c-5p	AGGCAGTGTAGTTAGCTGATTGC	chr11
hsa-miR-374a-5p	TTATAATACAACCTGATAAGT	chrX
hsa-miR-374b-5p	ATATAATACAACCTGCTAAGT	chrX
hsa-miR-378a-3p	ACTGGACTTGAGTCAGAAGGC	chr5
hsa-miR-409-3p	GAATGTTGCTCGGTGAACCCCT	chr14
hsa-miR-423-3p	AGCTCGGTCTGAGGCCCTCAGT	chr17
hsa-miR-424-5p	CAGCAGCAATTCATGTTTTGA	chrX
hsa-miR-4454	ATCCGAGTCACGGCACCA	chr4
hsa-miR-449a	TGGCAGTGTATTGTTAGCTGGT	chr5

miRNAs	Secuencia	Loci
hsa-miR-450a-5p	TTTTGCGATGTGTTTCCTAATAT	chrX
hsa-miR-450a-5p	TTTTGCGATGTGTTTCCTAATAT	chrX
hsa-miR-450b-5p	TTTTGCAATATGTTCCCTGAAT	chrX
hsa-miR-451a	AAACCGTTACCATTACTGAGT	chr17
hsa-miR-484	TCAGGCTCAGTCCCCTCCCGAT	chr16
hsa-miR-486-5p	TCCTGTACTGAGCTGCCCCGAG	chr8
hsa-miR-486-5p	TCCTGTACTGAGCTGCCCCGAG	chr8
hsa-miR-497-5p	CAGCAGCACACTGTGGTTTGT	chr17
hsa-miR-506-3p	GTAAGGCACCCTTCTGAGTAGA	chrX
hsa-miR-507	TTTTGCACCTTTTGGAGTGA	chrX
hsa-miR-508-3p	TGATTGTAGCCTTTTGGAGTAGA	chrX
hsa-miR-509-3-5p	TACTGCAGACGTGGCAATCATG	chrX
hsa-miR-509-3p	TGATTGGTACGTCTGTGGGTAGA	chrX
hsa-miR-509-3p	TGATTGGTACGTCTGTGGGTAGA	chrX
hsa-miR-509-3p	TGATTGGTACGTCTGTGGGTAGA	chrX
hsa-miR-509-5p	TACTGCAGACAGTGGCAATCATG	chrX
hsa-miR-509-5p	TACTGCAGACAGTGGCAATCATG	chrX
hsa-miR-513a-3p	TAAATTTACCTTTCTGAGA	chrX
hsa-miR-513a-3p	TAAATTTACCTTTCTGAGA	chrX
hsa-miR-513c-3p	TAAATTTACCTTTCTGAGA	chrX
hsa-miR-513c-5p	TTCTCAAGGAGGTGTCGTTTAT	chrX
hsa-miR-514a-3p	ATTGACACTTCTGTGAGTAGA	chrX
hsa-miR-514a-3p	ATTGACACTTCTGTGAGTAGA	chrX
hsa-miR-514a-5p	TACTCTGGAGAGTGACAATCATG	chrX
hsa-miR-514a-5p	TACTCTGGAGAGTGACAATCATG	chrX
hsa-miR-654-3p	TATGTCTGCTGACCATCACCT	chr14
hsa-miR-660-5p	TACCCATTGCATATCGGAGTTGT	chrX
hsa-miR-7977	TTCCCGGCCAACGCACCA	chr3
hsa-miR-92a-3p	TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT	chr13
hsa-miR-92a-3p	TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT	chrX
hsa-miR-92b-3p	TATTGCACTCGTCCCGGCCTCC	chr1
hsa-miR-93-5p	CAAAGTGCTGTTCTGTGCAGGTAG	chr7
hsa-miR-96-5p	TTTGGCACTAGCACATTTTGTCT	chr7
hsa-miR-98-5p	TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT	chrX
hsa-miR-99a-5p	AACCCGTAGATCCGATCTTGT	chr21
hsa-miR-99b-5p	CACCCGTAGAACCGACCTTGCG	chr19
mmu-miR-146a-5p	TGAGAACTGAATTCCATGGGTTT	chr5
mmu-miR-3968	ATCCCACTCCTGACACCA	chr1
mmu-miR-3968	ATCCCACTCCTGACACCA	chr18
oga-miR-100	AACCCGTAGATCCGAACCTTGTA	chr11
pal-miR-9993a-3p	ATCTCGGTGGGACCTCCA	chr2
pal-miR-9993a-3p	ATCTCGGTGGAACCTCCA	chr1

pal-miR-9993b-3p	ATCTCGCTGGGGCCTCCA	chr10
pal-miR-9993b-3p	ATCTCGCTGGGGCCTCCA	chr3
pal-miR-9995-3p	ATCTCGGTGGAACCTCCA	chr15

El umbral de significancia estadística se estableció con un valor de $p < 0.05$ en cada prueba. De acuerdo a estos valores se detectaron 259 miRNAs con expresión diferencial con valores estadísticamente significativos entre los diferentes grupos, 148 con una sobreexpresión (upregulated) en relación al grupo control y 111 miRNAs con una infraexpresión (downregulated) con respecto a los controles, los cuales se muestran en la Tabla 6. Ciento sesenta y seis miRNAs identificados corresponden a secuencias previamente descritas en humanos, de las cuales 100 son infraexpresados y 66 sobreexpresados se realizó una gráfica de mapa de calor y de volcán para representar la diferencia en la expresión de ambos grupos (Figuras 10 y 11).

Tabla 6. Listado de los miRNAs diferencialmente expresados con valores de $p < 0.05$

miRNA	miR_secuencia	sobre/ infra (Up/ Down)	fold_ change (Caso (media)/ Control (media))	log2 (fold_ change)	P value (t_test)	Control (media)	Caso (media)
efu-mir-9277-p5	GAAATCCATTGGGGTTTCCCC	up	2.86	1.52	2.75E-04	14	41
hsa-miR-654-3p	TATGTCTGCTGACCATCACCT	up	3.57	1.84	8.72E-04	273	976
hsa-miR-1185-1-3p	ATATACAGGGGAGACTCTTAT	up	4.25	2.09	9.53E-04	6	26
hsa-miR-432-5p	TCTTGGAGTAGGTCATTGGGTGT	up	4.08	2.03	1.18E-03	31	128
hsa-let-7b-3p	CTATACAACCTACTGCCTTCCT	up	2.02	1.01	1.28E-03	401	807
hsa-miR-487b-3p	AATCGTACAGGGTCATCCACTT	up	3.04	1.61	1.48E-03	72	218
hsa-miR-494-5p	AGGTTGTCCGTGTTGTCTTCT	up	4.87	2.28	1.50E-03	1	6
hsa-miR-758-3p	TTTGTGACCTGGTCCACTAACC	up	4.24	2.08	1.53E-03	77	328
eca-mir-8986a-p5	ATCGAGGCTAGAGTCACGCT	up	2.22	1.15	1.77E-03	90	199
hsa-miR-7704	CGGGGTCGGCGGCGACGTC	up	9.79	3.29	2.16E-03	7	67
hsa-miR-433-3p	ATCATGATGGGCTCCTCGGTGT	up	4.04	2.02	2.18E-03	15	61
PC-3p-72178_39	TGTTATGATGATGGGCGAA	up	5.39	2.43	2.18E-03	3	18
hsa-miR-127-3p	TCGGATCCGTCTGAGCTTGCT	up	6.37	2.67	2.18E-03	1,802	11,477
bta-miR-2404	TTGCACTGCATGGTATCTGCACT	up	2.67	1.42	2.21E-03	86	229
mmu-mir-6236-p3	TCAACTAGCTCTGAAAATGGATGGC	up	7.44	2.9	2.79E-03	10	75

Resultados

miRNA	miR_secuencia	sobre/ infra (Up/ Down)	fold_ change (Caso (media)/ Control (media))	log2 (fold_ change)	P value (t_test)	Control (media)	Caso (media)
mmu-mir-6236-p3	ACTCACCTGTCTGAATCAACT	up	7.44	2.9	2.79E-03	10	75
hsa-miR-379-5p	TGGTAGACTATGGAACGTAGG	up	2.59	1.37	2.92E-03	120	310
hsa-miR-214-5p	TGCCTGTCTACACTTGCTGTGC	up	2.6	1.38	3.17E-03	128	333
hsa-miR-134-5p	TGTGACTGGTTGACCAGAGGGG	up	3.92	1.97	3.26E-03	112	438
hsa-miR-409-3p	GAATGTTGCTCGGTGAACCCCT	up	2.72	1.44	3.30E-03	317	862
hsa-miR-431-5p	TGTCTTGCAGGCCGTCATGCA	up	2.3	1.2	3.72E-03	8	19
hsa-miR-382-5p	GAAGTTGTTCTGTTGGATTTCG	up	3.32	1.73	3.88E-03	14	47
bta-miR-2404	TTGCACTGCATGGTATCTGCAC	up	6.02	2.59	4.22E-03	3	15
hsa-miR-369-5p	AGATCGACCGTGTATATTCG	up	2.24	1.16	4.26E-03	26	58
hsa-miR-409-5p	AGGTTACCCGAGCAACTTTGCAT	up	2.87	1.52	4.34E-03	212	610
pal-miR-9993b-3p	ATCTCGCTGGGGCTTCCA	up	6.57	2.72	4.60E-03	2	10
hsa-miR-615-3p	TCCGAGCCTGGGTCTCCCTCT	up	2.53	1.34	4.83E-03	26	67
hsa-miR-543	AAACATTGCGGGTGCACTTCTT	up	2.53	1.34	5.65E-03	33	83
chi-miR-3955-5p	TTTGATGGCTGTCTCTCTACT	up	2.93	1.55	5.69E-03	11	33
mmu-mir-6236-p5	TCAACTAGCCCTAAAAAT	up	5.31	2.41	5.96E-03	12	65
eca-mir-8986b-5p	GCCGAGACTAGAGTCACATCCTGAC	up	5.12	2.36	6.42E-03	131	670
PC-5p-15635_254	TAGGGTGATGAAAAAGAATC	up	5.33	2.42	6.60E-03	8	43
hsa-miR-1291	GTGGCCCTGACTGAAGACCAGC	up	2.05	1.03	7.10E-03	61	125
mmu-mir-6236-p3	CAACTCACCTGCTGAATCAACT	up	17.3	4.11	7.21E-03	1	17
mmu-mir-6236-p3	GAAAATGGATGGTGTCTGG	up	17.3	4.11	7.21E-03	1	17
hsa-miR-483-3p	CACTCCTCTCTCCCGTCTTCT	up	2.57	1.36	7.32E-03	123	316
bta-mir-12034-p5	CGCCCCGGGGAGCCCGCGG	up	9.75	3.28	7.65E-03	0	4
bta-mir-12034-p5	CGCCCCGGGGAGCCCGGC	up	9.75	3.28	7.65E-03	0	4
hsa-miR-370-3p	GCCTGCTGGGGTGGAACCTGGT	up	4.18	2.07	8.02E-03	34	140
hsa-let-7b-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT	up	1.72	0.78	8.25E-03	8,520	14,620
mmu-mir-6240-p3	TCTGCCCAGTGCTCTGAATGTC	up	3.37	1.75	8.45E-03	36	121
hsa-miR-323a-3p	GCACATTACACGGTCGACCTCT	up	4.48	2.16	8.57E-03	30	133
hsa-miR-708-5p	AAGGAGCTTACAATCTAGCTGG	up	2.67	1.42	9.50E-03	100	269
hsa-miR-675-3p	CTGTATGCCCTCACCGCTCAGC	up	2.7	1.43	9.57E-03	33	89
pal-miR-9298-5p	ACAGATGATGAACTTATTGACGGGC	up	2.73	1.45	9.61E-03	204	558
hsa-miR-493-5p	TTGTACATGGTAGGCTTTCATT	up	2.93	1.55	1.02E-02	108	317
bta-miR-2478	GAATCCCACTTCTGACACCA	up	1.92	0.94	1.06E-02	47	89
hsa-miR-329-3p	AACACACCTGGTTAACCTCTTT	up	3.28	1.71	1.09E-02	13	43
mmu-miR-300-3p	TATGCAAGGGCAAGCTCTCT	up	6.39	2.68	1.09E-02	5	32
hsa-miR-4485-3p	CGGCCGCGGTACCCTAAC	up	6.21	2.63	1.11E-02	15	96

Resultados

miRNA	miR_secuencia	sobre/ infra (Up/ Down)	fold_ change (Caso (media)/ Control (media))	log2 (fold_ change)	P value (t_test)	Control (media)	Caso (media)
bta-miR-2404	TGCACTGCATGGTATCTGCACT	up	4.94	2.3	1.12E-02	1	7
bta-miR-2404	TTGCACTGCATGGTATCTGC	up	2.4	1.26	1.13E-02	19	45
hsa-miR-323b-3p	CCCAATACACGGTCGACCTCT	up	5.27	2.4	1.15E-02	17	87
efu-miR-9226	AGGTCCCTGTTCGGGCGCCG	up	3.38	1.76	1.16E-02	46	154
hsa-miR-125b-2-3p	ACAAGTCAGGCTCTTGGGACCT	up	1.88	0.91	1.17E-02	257	484
hsa-miR-381-3p	TATACAAGGGCAAGCTCTCTGT	up	2.84	1.51	1.18E-02	204	581
pal-miR-9993b-3p	AATCTCGCTGGGGCCTCCA	up	3.18	1.67	1.21E-02	52	164
pal-miR-9993b-3p	GATCTCGCTGGGGCCTCCA	up	3.18	1.67	1.21E-02	52	164
mmu-mir-6236-p3_4	CAACTCACCTGCCGAATCAACT	up	3.96	1.99	1.36E-02	362	1,432
mmu-mir-6236-p3_2	AGCCCTGAAAATGGATGG	up	3.96	1.99	1.36E-02	362	1,432
mmu-mir-6236-p3_1	ACAACCTCACCTGCCGAATCAACT	up	3.96	1.99	1.36E-02	362	1,432
mmu-mir-6236-p3_3	CAACTCACCTGCCGAATC	up	3.96	1.99	1.36E-02	362	1,432
mmu-mir-6236-p3_5	CAACTCACCTGCCGAATCAACTAGC	up	3.96	1.99	1.36E-02	362	1,432
hsa-miR-199a-5p	CCCAGTGTTTCAGACTACCTGTTC	up	2.54	1.35	1.37E-02	8,901	22,651
mmu-miR-3968	GAATCCCACTCCTGACACCA	up	1.82	0.86	1.39E-02	32	58
hsa-miR-377-5p	AGAGGTTGCCCTTGGTGAATTC	up	4.55	2.19	1.40E-02	13	60
bta-miR-11987	GAGGAAACTCTGGTGGAGGT	up	4.51	2.17	1.48E-02	9	39
hsa-miR-1247-5p	ACCCGTCCCGTTTCGTCCCGGA	up	6.53	2.71	1.49E-02	83	541
hsa-miR-381-5p	AGCGAGGTTGCCCTTTGTATATT	up	5	2.32	1.49E-02	2	12
hsa-miR-299-3p	TATGTGGGATGGTAAACCGCTT	up	2.34	1.22	1.50E-02	47	109
efu-mir-9298-p3	TGTGTGCTGATTGTCATGTTCTGATT	up	8.26	3.05	1.55E-02	1	11
hsa-miR-485-5p	AGAGGCTGGCCGTGATGAATTCG	up	4.62	2.21	1.57E-02	9	42
mmu-mir-6236-p5	TAACTCACCTGCCGAATCAACTAGC	up	7.88	2.98	1.57E-02	67	529
mmu-mir-6236-p5	TCGAATCAACTAGCCCTGA	up	7.88	2.98	1.57E-02	67	529
hsa-miR-193b-3p	AACTGGCCCTCAAAGTCCCGCT	up	2	1	1.61E-02	459	919
efu-mir-9277-p3	CATTGGGGTTTCCCGCGCAGGT	up	2.04	1.03	1.65E-02	177	361
hsa-miR-1251-5p	ACTCTAGCTGCCAAAGCGCT	up	24.99	4.64	1.68E-02	0	7
PC-3p-207761_11	GTCTTTGGGCCGAAACGAT	up	58.2	5.86	1.69E-02	0	7
cgr-miR-1260	ATCCCACTGCTGCCACCA	up	6.23	2.64	1.70E-02	4	27
PC-5p-9552_416	GAGCACCTGAATCTTTCCCAT	up	2.14	1.1	1.70E-02	199	426
hsa-miR-125a-5p	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGT	up	2.41	1.27	1.76E-02	23,767	57,221
hsa-miR-125b-5p	TCCCTGAGACCCTAACTTGTA	up	1.97	0.98	1.79E-02	20,416	40,270
bta-mir-2887-2-p5	GTCCGGTGCGGAGTGCCC	up	7.3	2.87	1.79E-02	33	239
PC-3p-52833_59	GTGTTCTGTGCTGAAGGCCT	up	9.72	3.28	1.81E-02	1	12
hsa-mir-10401-p5	AGGCGTGGGGTGCGGACCC	up	4.02	2.01	1.81E-02	2	8

Resultados

miRNA	miR_secuencia	sobre/ infra (Up/ Down)	fold_ change (Caso (media)/ Control (media))	log2 (fold_ change)	P value (t_test)	Control (media)	Caso (media)
hsa-miR-1468-5p	CTCCGTTTGCCTGTTTCGCTGA	up	5.32	2.41	1.87E-02	16	86
efu-mir-9298-p3	CACAGATGATGAACTTATTG	up	5.33	2.41	1.90E-02	7	35
mmu-mir-1983-p3	TAATGCCGAGGTTGTGAGTTC	up	2.3	1.2	1.93E-02	58	133
hsa-miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT	up	2.03	1.02	2.06E-02	374	761
hsa-miR-708-3p	CAACTAGACTGTGAGCTTCTAG	up	2.41	1.27	2.08E-02	13	32
hsa-miR-4508	AGCGGGGCTGGGCGCGCGC	up	13.92	3.8	2.10E-02	3	37
mmu-mir-6236-p3	TGGCGCTGGAGCGTCGGG	up	inf	inf	2.17E-02	0	4
hsa-miR-654-5p	TGGTGGGCCGAGAACATGTGC	up	4.54	2.18	2.19E-02	5	23
hsa-miR-665	ACCAGGAGGCTGAGGCCCT	up	5.2	2.38	2.29E-02	2	12
cgr-mir-1285-p5	CTCCCGTGCTGATCAGTA	up	5.7	2.51	2.34E-02	9	50
PC-5p-63560_47	TTCTCGTTGGGGCCTCCA	up	9.39	3.23	2.36E-02	2	21
pal-miR-9993b-3p	ATCTCGTGGGGTCTCCA	up	4.83	2.27	2.36E-02	3	12
bta-miR-2478	AATCCCACTTCTGACACCA	up	2.55	1.35	2.41E-02	90	230
PC-5p-112032_22	AATTCATCGTGATGGGGA	up	10.72	3.42	2.44E-02	1	7
hsa-miR-134-3p	CTGTGGGCCACCTAGTCACCA	up	6.28	2.65	2.64E-02	2	16
bta-miR-2478	GGATCCCACTTCTGACACCA	up	1.87	0.9	2.74E-02	29	54
mdo-miR-12321-3p	CCTGCCCTCCCTTCCCCC	up	106.56	6.74	2.79E-02	0	8
hsa-miR-1197	TAGGACACATGGTCTACTTCT	up	3.97	1.99	2.84E-02	2	9
PC-3p-54501_57	TCCCTGGTTGATCCTGCC	up	4.95	2.31	2.94E-02	2	10
mmu-miR-3968	AATCCCACTCCTGACACCA	up	1.74	0.8	3.00E-02	287	500
bta-miR-11987	GGAAACTCTGGTGAGGT	up	5.13	2.36	3.09E-02	2	9
cgr-miR-1260	ATCCACCGTTGCCACCA	up	6.11	2.61	3.14E-02	3	15
hsa-miR-1299	TTCTGGAATTCTGTGTGAGGGA	up	7.48	2.9	3.16E-02	4	28
sha-miR-199a	ACAGTAGTCTGCACATTGGCA	up	2.25	1.17	3.18E-02	9	19
dno-miR-134-5p	TGTGACTGGTTGACCAGAGGGAT	up	4.13	2.04	3.22E-02	3	11
pal-miR-9995-3p	GATCTCGGTGGAACCTCCA	up	2.17	1.12	3.25E-02	14	29
pal-miR-9995-3p	CATCTCGGTGGAACCTCCA	up	2.17	1.12	3.25E-02	14	29
mmu-miR-6412_L-4	AACCATCCTCTGCTACTA	up	3.74	1.9	3.25E-02	9	36
efu-mir-9298-p5	CACAGATGATGAACTTATTGACGGGC	up	1.98	0.98	3.26E-02	17	33
efu-mir-9298-p5	CACAGATGATGAACTTATT	up	1.98	0.98	3.26E-02	17	33
hsa-miR-410-3p	AATATAACACAGATGGCCTGT	up	2.24	1.16	3.26E-02	47	104
bta-mir-502b-p3	ATCCACCTGGGCAAGGATTCT	up	2.96	1.57	3.32E-02	1	4
hsa-miR-127-5p	CTGAAGCTCAGAGGGCTCTGATT	up	2.49	1.32	3.39E-02	83	207
hsa-miR-496	AGTATTACATGGCCAATCTCC	up	2.33	1.22	3.47E-02	7	16
hsa-miR-1224-3p	CCCCACCTCCTCTCTCCTCAGT	up	3.51	1.81	3.57E-02	4	12

Resultados

miRNA	miR_secuencia	sobre/ infra (Up/ Down)	fold_ change (Caso (media)/ Control (media))	log2 (fold_ change)	P value (t_test)	Control (media)	Caso (media)
mml-miR-199a	CCCAGTGTTTCAGACTACCTTTC	up	3.14	1.65	3.59E-02	13	39
ssc-miR-10386_L+2	CCGTCGTCCTCTCCCTCCCTCCT	up	inf	inf	3.62E-02	0	22
PC-5p-156455_15	TTTAGGATCCAAATGAGATAT	up	39.55	5.31	3.65E-02	0	3
PC-3p-40287_85	CCCAGTGTTTCAGACCTGTT	up	18.02	4.17	3.66E-02	1	11
hsa-miR-4492_L+1	CGGGGCTGGGCGCGCGCC	up	23.12	4.53	3.68E-02	2	52
bta-miR-11987_L	GAGGAAACTCTGGTGGAGG	up	4.77	2.25	3.70E-02	2	12
PC-5p-80289_34	CCCCCGAGTGGTCGGCGTC	up	17.14	4.1	3.71E-02	1	12
hsa-miR-199b-3p	ACAGTAGTCTGCACATTGGTT	up	2.05	1.03	3.78E-02	2,737	5,604
cgr-miR-1260	ATCCCACCGCTGCCACTA	up	6.34	2.66	4.07E-02	4	25
hsa-miR-889-3p	TTAATATCGGACAACCATTGT	up	2.35	1.23	4.11E-02	56	131
ssc-mir-4335-p3	CGCCCCACGTTGGGCGCCA	up	3.16	1.66	4.11E-02	5	14
mmu-miR-5100	CGAATCCCAGCGGTGCCTCC	up	3.08	1.62	4.15E-02	11	35
pal-miR-9993b-3p	CTCTCGCTGGGGCCTCCA	up	4.38	2.13	4.25E-02	1	6
hsa-miR-485-3p	GTCATACACGGCTCTCCTCTCT	up	3.12	1.64	4.27E-02	39	123
bta-miR-2478	ATCCCATTCTGACACCA	up	4.45	2.15	4.38E-02	7	29
PC-5p-119973_20	TGTCTAGTGGGCCACTTTTGG	up	53.79	5.75	4.39E-02	1	32
bta-miR-1949_L-4	CCAGGATGCCAGCATAGTT	up	4.83	2.27	4.39E-02	0	2
cgr-mir-1285-p3	CTGCACTCCAGCCTGAGC	up	3.32	1.73	4.42E-02	84	280
hsa-mir-7108-p3	CCCCGCCCCACCCGCGC	up	7.8	2.96	4.56E-02	3	25
ssc-mir-1285-p5	TCGCGCCTGTGAATAGCCACTGC	up	5.89	2.56	4.65E-02	283	1,669
sha-miR-125a	CTGAGACCCTAACTTGTA	up	14.07	3.81	4.68E-02	0	3
PC-5p-146696_16	TTTATTGGCCTCTTCTACC	up	20.6	4.36	4.68E-02	0	7
hsa-miR-1908-5p	CGGCGGGGACGGCGATTGGT	up	24.9	4.64	4.73E-02	0	4
hsa-miR-125b-1-3p	ACGGGTTAGGCTCTTGGGAGCT	up	1.49	0.57	4.83E-02	64	95
hsa-miR-337-5p	GAACGGCTTCATACAGGAGT	up	2.16	1.11	4.87E-02	18	38
hsa-miR-323a-5p	AGGTGGTCCGTGGCGGTTTCGC	up	inf	inf	4.92E-02	0	1
mmu-mir-6240-p5	CCCAGTGCTCTGAATGTC	up	4.36	2.12	4.96E-02	167	730
cpo-miR-328-3p	CTGGCCCTCTCTGCCCTTCTGT	up	3.57	1.84	4.97E-02	2	8
mmr-miR-1839	AAGGTAGATAGAACAGGTCTTGT	down	0.38	-1.39	7.60E-06	292	111
hsa-miR-106b-5p	TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT	down	0.43	-1.23	7.75E-05	467	199
hsa-miR-30a-3p	CTTTCAGTCGATGTTTGCAGC	down	0.38	-1.39	9.56E-05	1,013	387
hsa-miR-130a-3p	CAGTGCAATGTAAAAGGGCAT	down	0.43	-1.22	2.91E-04	699	301
hsa-miR-16-5p	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG	down	0.41	-1.29	3.62E-04	4,173	1,707
hsa-miR-30a-5p	TGTAAACATCCTCGACTGGAAGCT	down	0.38	-1.39	9.21E-04	12,668	4,836
hsa-miR-126-3p	TCGTACCGTGAGTAATAATGC	down	0.52	-0.93	1.22E-03	6,112	3,197

Resultados

miRNA	miR_secuencia	sobre/ infra (Up/ Down)	fold_ change (Caso (media)/ Control (media))	log2 (fold_ change)	P value (t_test)	Control (media)	Caso (media)
hsa-miR-28-5p	AAGGAGCTCACAGTCTATTGA	down	0.64	-0.65	1.22E-03	264	168
hsa-miR-425-3p	CATCGGGAATGTCGTGTCCGCC	down	0.42	-1.26	1.24E-03	55	23
hsa-miR-425-5p	AATGACACGATCACTCCCGTTGAGT	down	0.32	-1.63	1.33E-03	683	221
hsa-miR-296-5p	AGGGCCCCCCTCAATCCTGT	down	0.44	-1.2	1.36E-03	103	45
hsa-miR-31-3p	TGCTATGCCAACATATTGCCATC	down	0.29	-1.77	1.45E-03	37	11
hsa-miR-17-5p	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG	down	0.27	-1.9	1.58E-03	845	227
hsa-miR-106a-5p	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG	down	0.27	-1.9	1.58E-03	845	227
hsa-miR-16-1-3p	CCAGTATTAACGTGTGCTGCTGA	down	0.22	-2.21	1.62E-03	23	5
hsa-miR-203b-3p	TTGAAGTGTCAAGAACCACTGG	down	0.09	-3.51	2.79E-03	5	0
hsa-miR-3180-5p	CTTCCAGACGCTCCGCCCACT	down	0.04	-4.66	2.86E-03	5	0
hsa-miR-181c-5p	AACATTCAACCTGTCCGTGAGT	down	0.51	-0.98	3.20E-03	147	75
hsa-miR-592	TTGTGTCAATATGCGATGATGT	down	0.03	-4.89	3.22E-03	7	0
hsa-miR-935	CAGTTACCGCTTCCGCTACCGC	down	0.15	-2.75	3.30E-03	26	4
hsa-miR-525-3p	GAAGGCGCTTCCCTTTAGAGC	down	-inf	-inf	3.97E-03	2	0
hsa-miR-629-3p	GTTCTCCCAACGTAAGCCCAGC	down	0.05	-4.27	4.15E-03	5	0
hsa-miR-130b-5p	ACTCTTTCCCTGTTGCACTACT	down	0.31	-1.69	4.43E-03	97	30
hsa-miR-449b-3p	CAGCCACAACCTACCTGCCACT	down	0.01	-7.22	5.02E-03	65	0
hsa-miR-25-3p	CATTGCACTTGTCTCGGTCTGA	down	0.45	-1.16	5.13E-03	3,820	1,707
hsa-miR-30c-5p	TGTAAACATCCTACACTCTCAGCT	down	0.51	-0.97	5.49E-03	9,447	4,815
hsa-miR-519a-2-5p	CCTCTACAGGGAAGCGCTTTCT	down	0.03	-4.94	5.84E-03	6	0
hsa-miR-7162-3p	TCTGAGGTGGAACAGCAGC	down	-inf	-inf	6.02E-03	7	0
hsa-miR-17-3p	ACTGCAGTGAGGGCACTTGTAG	down	0.43	-1.21	6.38E-03	163	70
hsa-miR-20b-5p	CAAAGTGCTCATAGTGCAGGTAG	down	0.16	-2.65	6.38E-03	60	10
hsa-miR-27a-5p	AGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCA	down	0.55	-0.87	7.09E-03	28	16
hsa-miR-891a-5p	TGCAACGAACCTGAGCCACTGA	down	0.02	-5.79	7.10E-03	83	1
hsa-miR-3940-3p	CAGCCCGGATCCCAGCCCACT	down	0.2	-2.31	7.73E-03	15	3
hsa-miR-375-3p	TTGTTCGTTCGGCTCGCGTGA	down	0.29	-1.76	7.73E-03	160	47
PC-5p-15512_256	TCCTGCCCTCTTCCTCAGC	down	-inf	-inf	8.93E-03	26	0
hsa-let-7g-5p	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT	down	0.61	-0.71	8.96E-03	11,277	6,910
hsa-miR-92a-3p	TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT	down	0.65	-0.62	1.01E-02	11,412	7,444
hsa-miR-767-3p	TCTGCTCATACCCCATGGTTTC	down	0.03	-5.08	1.13E-02	4	0
hsa-miR-182-5p	TTTGGCAATGGTAGAACTCACACT	down	0.45	-1.14	1.20E-02	392	178
hsa-miR-18a-3p	ACTGCCCTAAGTGCTCTTCTGT	down	0.17	-2.54	1.26E-02	42	7
hsa-miR-15b-5p	TAGCAGCACATCATGGTTTACA	down	0.34	-1.56	1.29E-02	1,715	580
hsa-miR-216b-5p	AAATCTCTGCAGGCAAATGTGA	down	0.03	-5	1.29E-02	12	0

Resultados

miRNA	miR_secuencia	sobre/ infra (Up/ Down)	fold_ change (Caso (media)/ Control (media))	log2 (fold_ change)	P value (t_test)	Control (media)	Caso (media)
hsa-miR-7-1-3p	CAACAAATCACAGTCTGCCATT	down	0.18	-2.49	1.33E-02	88	16
mmu-miR-1948-5p	TATGAGTATTCTGCCTAAATGT	down	0.11	-3.21	1.47E-02	5	1
hsa-miR-18b-5p	TAAGGTGCATCTAGTGCAGTT	down	0.09	-3.55	1.50E-02	5	0
hsa-miR-518d-3p	CAAAGCGCTTCCCTTTGGAGC	down	-inf	-inf	1.67E-02	3	0
hsa-miR-371a-5p	ACTCAAAGTGTGGGGGCACTTT	down	0.09	-3.49	1.80E-02	12	1
hsa-miR-767-5p	TGCACCATGGTTGTCTGAGCATGC	down	-inf	-inf	1.85E-02	8	0
hsa-miR-103a-3p	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA	down	0.67	-0.58	1.90E-02	1,666	1,115
hsa-miR-520a-5p	CTCCAGAGGGAAGTACTTTCT	down	0.06	-4.18	2.06E-02	31	2
hsa-miR-105-5p	TCAAATGCTCAGACTCCTGTGGT	down	0.03	-5.21	2.08E-02	6	0
hsa-miR-10a-5p	TACCCTGTAGATCCGAATTTGT	down	0.3	-1.75	2.22E-02	6,198	1,842
hsa-miR-518b	CAAAGCGCTCCCTTTAGAGGT	down	0.05	-4.42	2.26E-02	51	2
hsa-miR-4433b-5p	ATGTCCACCCCCACTCCTGTT	down	0.23	-2.13	2.30E-02	85	19
hsa-miR-520h	ACAAAGTGCTTCCCTTTAGAGT	down	0.05	-4.23	2.37E-02	9	0
hsa-mir-12127-p3	TAAAGGTATACTCGTTACAGGCC	down	0.06	-4.07	2.51E-02	3	0
hsa-miR-519d-3p	CAAAGTGCTCCCTTTAGAGTGT	down	0.02	-5.4	2.56E-02	70	2
hsa-miR-92a-1-5p	AGGTTGGGATCGGTTGCAATGCT	down	0.33	-1.6	2.62E-02	12	4
hsa-miR-525-5p	CTCCAGAGGGATGCACTTTCTC	down	0.22	-2.18	2.63E-02	15	3
hsa-miR-34c-3p	AATCACTAACCACACGGCCAGG	down	0.1	-3.3	2.69E-02	170	17
hsa-miR-142-3p	GTAGTGTTTCCTACTTTATGGA	down	0.34	-1.57	2.74E-02	2,093	707
hsa-miR-532-5p	CATGCCTTGAGTGTAGGACCGT	down	0.82	-0.29	2.76E-02	489	399
hsa-miR-101-2-5p	TCGGTTATCATGGTACCGATGCT	down	0.23	-2.13	2.76E-02	2	1
hsa-miR-760	CGGCTCTGGGTCTGTGGGGAGT	down	0.29	-1.81	2.78E-02	19	6
hsa-miR-21-5p	TAGCTTATCAGACTGATGTTGAC	down	0.52	-0.96	2.78E-02	51,252	26,412
hsa-miR-23b-3p	ATCACATTGCCAGGGATTACC	down	0.5	-0.99	2.85E-02	3,515	1,769
ggo-mir-375-p5	CCGGGCCCTCCGCTCCCGCCCC	down	-inf	-inf	2.90E-02	1	0
hsa-miR-625-3p	GACTATAGAACTTTCCCCCTCA	down	0.16	-2.67	2.98E-02	216	34
hsa-miR-421	ATCAACAGACATTAATTGGGCGC	down	0.65	-0.61	3.01E-02	70	46
hsa-miR-518e-5p	CTCTAGAGGGAAGCGCTTTCT	down	0.04	-4.73	3.16E-02	10	0
hsa-miR-520f-5p	CTCTAGAGGGAAGCGCTTTCT	down	0.04	-4.73	3.16E-02	10	0
hsa-miR-34b-3p	AATCACTAACTCCACTGCCATC	down	0.09	-3.55	3.17E-02	431	37
cpo-miR-7-3-3p	CAACAAGTCACAGCCGGCCTC	down	-inf	-inf	3.38E-02	1	0
hsa-miR-15b-3p	CGAATCATTATTTGCTGCTCT	down	0.34	-1.54	3.38E-02	148	51
hsa-miR-148b-3p	TCAGTGCATCACAGAACTTTGT	down	0.65	-0.63	3.44E-02	1,233	797
hsa-miR-518e-3p	AAAGCGCTTCCCTTCAGAGTGT	down	0.02	-5.48	3.44E-02	29	1
hsa-miR-192-3p	CTGCCAATTCCATAGGTCACAGT	down	0.05	-4.31	3.54E-02	55	3

Resultados

miRNA	miR_secuencia	sobre/ infra (Up/ Down)	fold_ change (Caso (media)/ Control (media))	log2 (fold_ change)	P value (t_test)	Control (media)	Caso (media)
hsa-miR-363-3p	AATTGCACGGTATCCATCTGTA	down	0.4	-1.31	3.60E-02	150	60
hsa-miR-3200-3p	CACCTTGCGCTACTCAGGTCTGT	down	0.16	-2.69	3.61E-02	15	2
hsa-miR-215-5p	ATGACCTATGAATTGACAGACA	down	0.47	-1.09	3.73E-02	37	17
hsa-miR-4755-5p	TTTCCCTTCAGAGCCTGGCTTA	down	-inf	-inf	3.74E-02	1	0
hsa-mir-518b-p5	CTCCAGAGGGAAGCGCTTTCT	down	0.08	-3.69	3.76E-02	2	0
mmu-miR-760-5p	CCCCTCAGTCCACCAGAGCCCGGAT	down	-inf	-inf	3.77E-02	1	0
hsa-miR-93-5p	CAAAGTGCTGTTTCGTGACGGTAG	down	0.29	-1.8	3.96E-02	1,657	477
mmu-miR-101c	NACAGTACTGTGATAGCTGAAGT	down	0.28	-1.83	3.96E-02	13	4
hsa-miR-340-5p	TTATAAAGCAATGAGACTGATT	down	0.4	-1.34	3.96E-02	544	215
hsa-miR-3614-3p	TAGCCTTCAGATCTTGGTGTTT	down	0.11	-3.24	3.96E-02	3	0
hsa-miR-892a	CACTGTGTCCTTTCTGCGTAGA	down	-inf	-inf	3.98E-02	3	0
PC-3p-130419_18	ATGTGCCTAGTGGCTGCTGTCT	down	0.26	-1.93	3.99E-02	4	1
hsa-miR-181a-5p	AACATTCAACGCTGTCGGTGAGT	down	0.58	-0.78	4.01E-02	1,315	768
hsa-miR-18b-3p	TACTGCCCTAAATGCCCCCTTCT	down	0.07	-3.91	4.09E-02	3	0
mmu-let-7	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTTAT	down	0.49	-1.03	4.11E-02	152	74
hsa-miR-3158-3p	AAGGGCTTCCTCTCTGCAGGAC	down	0.04	-4.79	4.15E-02	10	0
hsa-miR-371a-3p	AAGTGCCGCCATCTTTTGAGTGT	down	-inf	-inf	4.18E-02	5	0
hsa-miR-518a-3p	AAAGCGCTTCCCTTTGCTGGAT	down	0.01	-6.89	4.23E-02	7	0
hsa-miR-3617-3p	CATCAGCACCTATGTCCTTTC	down	-inf	-inf	4.39E-02	1	0
ggo-miR-202_L-1	AGAGGTATAGGGCATGGGAAA	down	0.54	-0.9	4.42E-02	276	148
hsa-miR-340-3p	TCCGTCTCAGTTACTTTATAGC	down	0.47	-1.09	4.42E-02	104	49
hsa-miR-148a-5p	AAAGTTCTGAGACACTCCGACT	down	0.56	-0.83	4.44E-02	69	39
hsa-miR-498-3p	AAAGCACCTCCAGAGCTTGAAGC	down	-inf	-inf	4.47E-02	12	0
hsa-miR-517-5p	CCTCTAGATGGAAGCACTGTCT	down	0.1	-3.31	4.49E-02	1	0
hsa-miR-670-5p	GTCCCTGAGTGATGTGGTGAAC	down	0.21	-2.27	4.59E-02	9	2
pal-miR-9226-5p	GTCCCTGTTTCAGGCGCCA	down	0.07	-3.86	4.67E-02	21	1
hsa-miR-7154-5p	TTCATGAACTGGGTCTAGCTTGGAGC	down	-inf	-inf	4.74E-02	23	0
hsa-miR-128-3p	TCACAGTGAACCGGTCTCTTT	down	0.57	-0.82	4.78E-02	296	167
hsa-miR-515-3p	GAGTGCCTTCTTTTGAGCGTT	down	-inf	-inf	4.80E-02	7	0
hsa-miR-18a-5p	TAAGGTGCATCTAGTGCAGATAG	down	0.3	-1.76	4.83E-02	153	45
hsa-miR-212-5p	ACCTTGCTCTAGACTGCTTACT	down	0.67	-0.58	4.86E-02	26	17
hsa-miR-518d-5p	CTCTAGAGGGAAGCACTTCT	down	0.02	-5.87	4.86E-02	10	0
hsa-miR-518f-5p	CTCTAGAGGGAAGCACTTCT	down	0.02	-5.87	4.86E-02	10	0
hsa-miR-4780	ACCCTTGAGCCTGATCCCTAGC	down	0.11	-3.2	4.93E-02	2	0

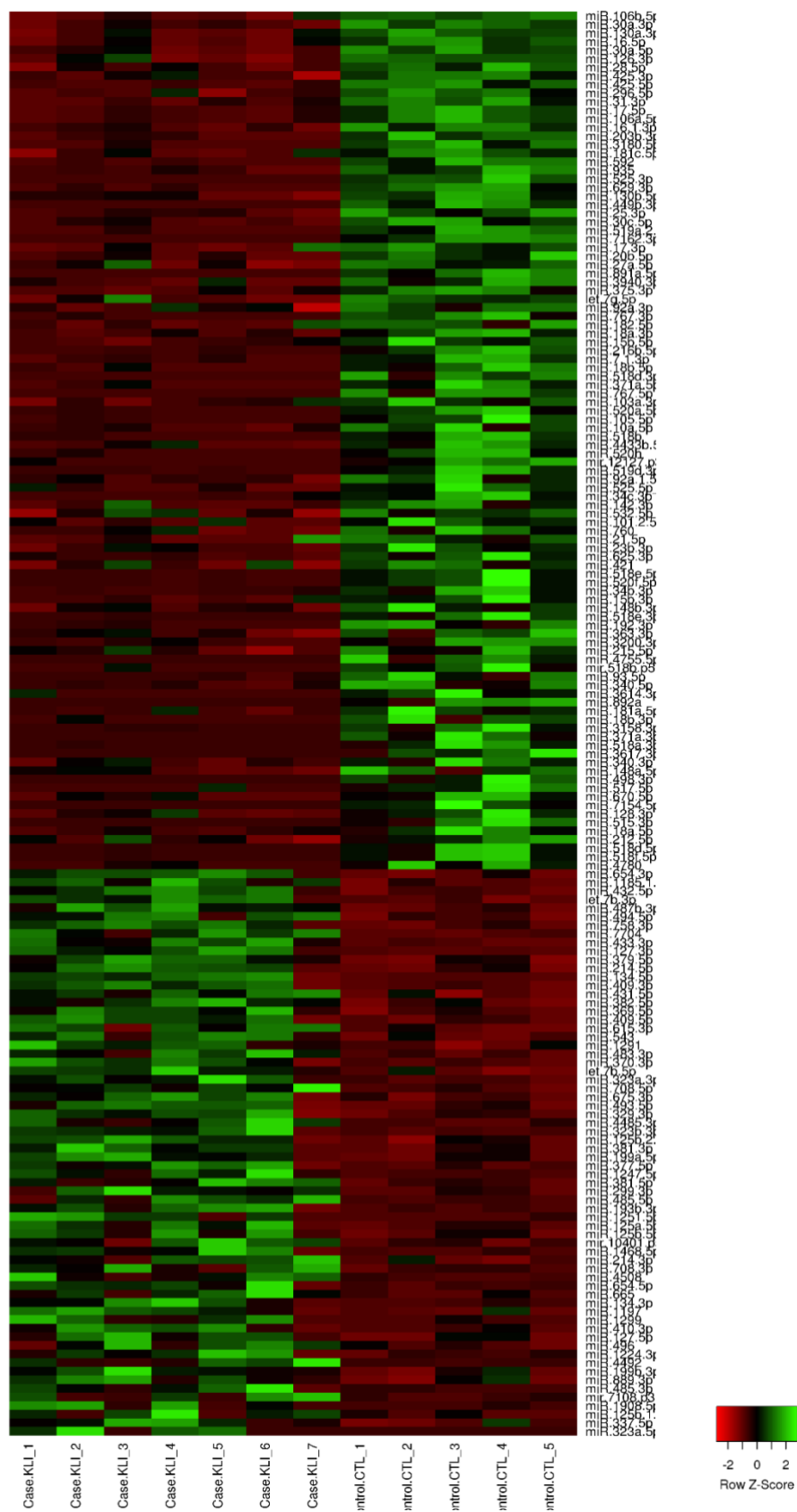


Figura 10. Mapa de calor de los 166 miRNAs diferencialmente expresados que muestra valores de $p < 0.05$.

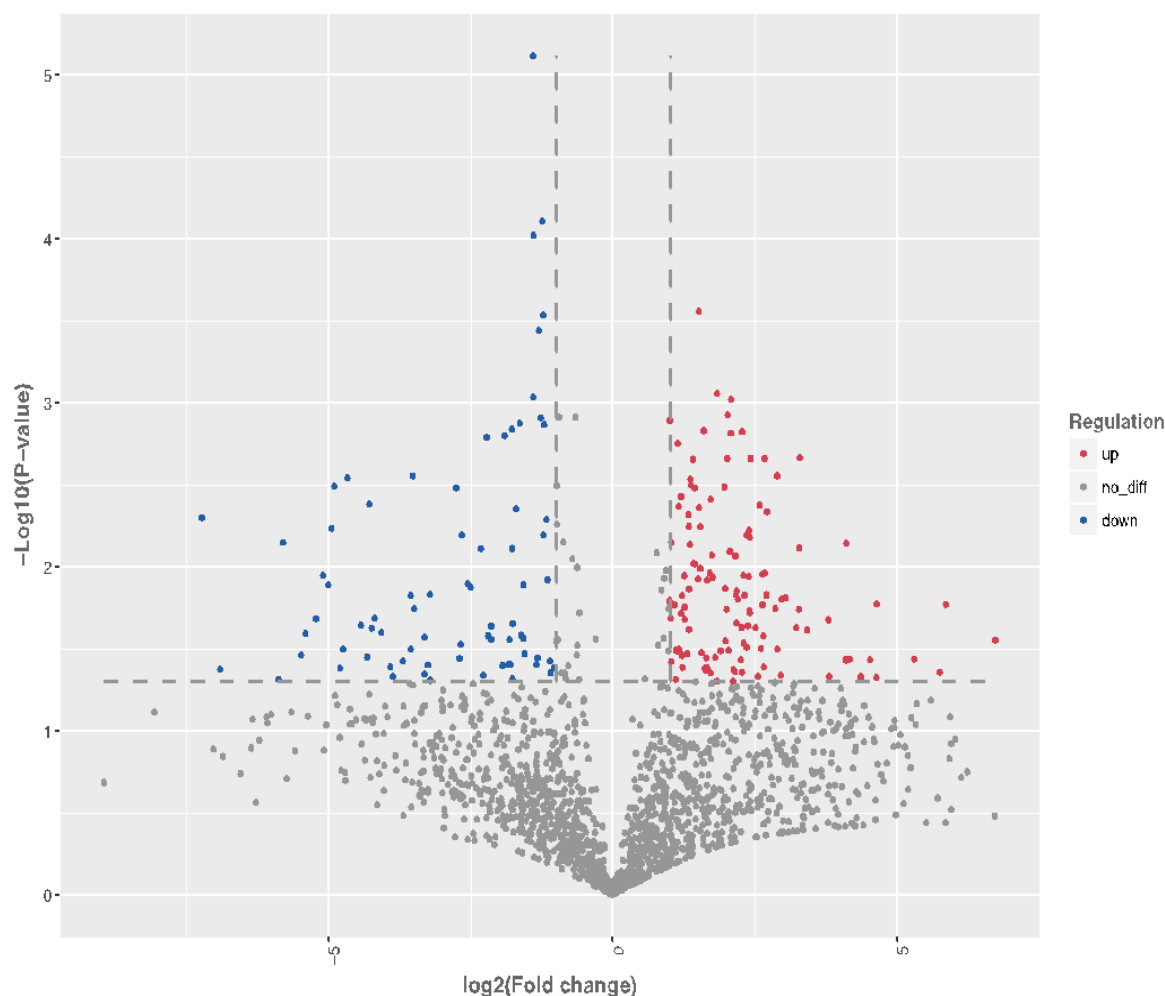


Figura 11. Gráfica de Volcán entre los miRNAs de expresión diferencial con una $p < 0.05$.

De los 166 miRNAs de expresión diferencial descritos en humanos (hsa), 27 muestran un nivel de alta expresión con valores de lecturas por encima del promedio, de estos 20 muestra una infraexpresión con respecto al grupo control (downregulated) y 7 presentan una sobreexpresión (upregulated) con respecto al grupo control. Estos 27 miRNAs se muestran en la Tabla 7. Siendo estos miRNAs los más abundantes en el análisis de expresión, se consideraron para realizar un subestudio de enriquecimiento y análisis de interactoma.

Tabla 7. Lista de los miRNAs con un nivel de expresión alto en relación al resto de los miRNAs detectados en el análisis.

miR_name	up/down	log2 (fold_change)	P value (t test)
hsa-miR-654-3p	up	1.84	8.72E-04
hsa-miR-127-3p	up	2.67	2.18E-03
hsa-let-7b-5p	up	0.78	8.25E-03
hsa-miR-199a-5p	up	1.35	1.37E-02
hsa-miR-125a-5p	up	1.27	1.76E-02
hsa-miR-125b-5p	up	0.98	1.79E-02
hsa-miR-199b-3p	up	1.03	3.78E-02
hsa-miR-106b-5p	down	-1.23	7.75E-05
hsa-miR-30a-3p	down	-1.39	9.56E-05
hsa-miR-16-5p	down	-1.29	3.62E-04
hsa-miR-30a-5p	down	-1.39	9.21E-04
hsa-miR-126-3p	down	-0.93	1.22E-03
hsa-miR-17-5p	down	-1.9	1.58E-03
hsa-miR-106a-5p	down	-1.9	1.58E-03
hsa-miR-25-3p	down	-1.16	5.13E-03
hsa-miR-30c-5p	down	-0.97	5.49E-03
hsa-let-7g-5p	down	-0.71	8.96E-03
hsa-miR-92a-3p	down	-0.62	1.01E-02
hsa-miR-15b-5p	down	-1.56	1.29E-02
hsa-miR-103a-3p	down	-0.58	1.90E-02
hsa-miR-10a-5p	down	-1.75	2.22E-02
hsa-miR-142-3p	down	-1.57	2.74E-02
hsa-miR-21-5p	down	-0.96	2.78E-02
hsa-miR-23b-3p	down	-0.99	2.85E-02
hsa-miR-148b-3p	down	-0.63	3.44E-02
hsa-miR-93-5p	down	-1.8	3.96E-02
hsa-miR-181a-5p	down	-0.78	4.01E-02

Predicción de objetivos de los miRNAs expresados diferencialmente.

Para predecir los genes diana a los cuales están dirigidos la mayoría de los miRNAs que se observaron, se utilizaron dos algoritmos computacionales de predicción de objetivos TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) y Miranda 3.3a (<http://www.microrna.org/>) para identificar sitios de unión a miRNA. Finalmente, se combinaron los datos predichos por ambos algoritmos y se calcularon las superposiciones. Los términos GO de los miRNAs más abundantes, así como los objetivos de miRNA fueron evaluados.

Los genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados fueron 9870 genes. Se procedió a un sub-análisis de estos de acuerdo a su asociación con enfermedad humana y al fenotipo descrito en mamíferos usando los términos seleccionados para la búsqueda que incluyeron infertilidad masculina, azoospermia, oligospermia, Síndrome de solo células de Sertoli, y falla gonadal masculina, mientras que, para los fenotipos en mamíferos, la búsqueda se enfocó en diferentes términos relacionados que se muestran en la Tabla 8. La plataforma empleada para una búsqueda de enfermedades humanas asociadas fue OMIM (McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), s.f.) y para fenotipos en mamíferos la plataforma de Mouse Genome Informatics MGI (Cimino et al., 2017Bult et al., 2019;) (The Mouse Genome Database Group. 2019).

Se estableció una lista de 64 genes diana con fenotipos asociados a los términos descritos en la búsqueda, los cuales se muestran en la Tabla 9.

Tabla 8. Fenotipos utilizados para la búsqueda de genes diana candidatos, en reportes de mamíferos, se utilizó los recursos disponibles en el sitio web de Mouse Genome Informatics.

Términos utilizados para la búsqueda de genes diana

Infertilidad masculina
Disminución de células germinales
Atrofia testicular
Azoospermia
Arresto de meiosis masculina
Aumento de la apoptosis de las células germinales masculinas
Morfología testicular anormal
Espermatogénesis anormal
Oligospermia
Fisiología anormal del sistema reproductor masculino
Disminución del número de células germinales masculinas
Arresto de espermatogénesis
Meiosis masculina anormal
Apoptosis anormal de celular germinales masculinas
Morfología anormal de células de Sertoli
Morfología anormal de espermatide
Morfología anormal del núcleo espermático
Desarrollo anormal de células de Sertoli
Morfología anormal del espermatocono
Diferenciación anormal de las células adultas de Leydig
Células germinales ausentes
Disminución del número de células germinales primordiales
Disminución de la proliferación de células germinales primordiales
Apoptosis anormal
Proliferación anormal de la espermatogonia
Morfología anormal de las células germinales masculinas
Morfología anormal de espermatogonia
Morfología anormal de la barrera de células de Sertoli
Gametogénesis anormal
Desarrollo testicular anormal
Morfología de glándulas sexuales anormal
Nivel de testosterona anormal
Migración anormal de las células germinales primordiales
Proliferación anormal de células primordiales
Morfología anormal de células germinales primordiales
Fertilidad/Fecundación anormal
Degeneración testicular

*Tabla 9. Genes diana de los miRNAs diferencialmente expresados, que se han asociados con fenotipos de infertilidad masculina y desarrollo anormal de las células germinales y/o del tejido testicular. *Genes previamente reportados como causales de infertilidad en humanos.*

Gen	Ortólogo	Nombre	Fenotipo reportado
<i>YTHDC2</i>	Ythdc2	Yth domain containing 2	Infertilidad masculina
			Disminución de células germinales
			Atrofia testicular
			Azoospermia
			Arresto de meiosis masculina
			Aumento de la apoptosis de las células germinales masculinas
<i>ESR1</i>	Esr1	Estrogen receptor 1 (alpha)	Morfología testicular anormal
			Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Oligospermia
			Atrofia testicular
			Fisiología anormal del sistema reproductor masculino
<i>HSP90AA1</i>	Hsp90aa1	Heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class a member 1	Disminución del número de células germinales masculinas
			Arresto de espermatogénesis
			Infertilidad masculina
			Atrofia testicular
			Azoospermia
			Meiosis masculina anormal
<i>HOXA11</i>	Hoxa10	Homeobox a10	Arresto de meiosis masculina
			Apoptosis anormal de celular germinales masculinas
			Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Morfología anormal de células de Sertoli
			Azoospermia
			Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Azoospermia
			Apoptosis anormal de celular germinales masculinas
Gen	Ortólogo	Nombre	Fenotipo reportado

<i>MKRN2</i>	Mkrm2	Makorin, ring finger protein, 2	<p>Infertilidad masculina</p> <p>Oligospermia</p> <p>Morfología anormal de células de Sertoli</p> <p>Morfología anormal de espermatide</p>
<i>PVR</i>	Nectin2	Nectin cell adhesion molecule 2	<p>Infertilidad masculina</p> <p>Espermatogénesis anormal</p> <p>Morfología anormal de células de Sertoli</p> <p>Morfología anormal del núcleo espermático</p>
<i>SIRT1</i>	Sirt1	Sirtuin 1	<p>Arresto de espermatogénesis</p> <p>Espermatogénesis anormal</p> <p>Infertilidad masculina</p> <p>Oligospermia</p> <p>Desarrollo anormal de células de Sertoli</p> <p>Morfología anormal del espermatozoido</p> <p>Morfología anormal de espermatide</p> <p>Arresto de meiosis masculina</p> <p>Apoptosis anormal de células germinales masculinas</p> <p>Diferenciación anormal de las células de Leydig</p>
<i>TSC2</i>	Tsc2	Tsc complex subunit 2	<p>Morfología testicular anormal</p> <p>Espermatogénesis anormal</p> <p>Desarrollo anormal de células de Sertoli</p> <p>Disminución del número de células germinales masculinas</p>
<i>FANCL</i>	Fanc1	Fanconi anemia, complementation group 1	<p>Infertilidad masculina</p> <p>Oligospermia</p> <p>Desarrollo anormal de células de Sertoli</p> <p>Células germinales ausentes</p> <p>Disminución del número de células germinales masculinas</p> <p>Disminución del número de células germinales primordiales</p> <p>Disminución de la proliferación de células germinales primordiales</p>

Gen**Ortólogo****Nombre****Fenotipo reportado**

<i>CYP26B1</i>	Cyp26b1	Cytochrome p450, family 26, subfamily b, polypeptide 1	Espermatogénesis anormal Apoptosis anormal Disminución del número de células germinales masculinas Meiosis masculina anormal Apoptosis anormal de celular germinales masculinas
<i>RANBP9</i>	Ranbp9	Ran binding protein 9	Infertilidad masculina Proliferación anormal de la espermatogonia Oligospermia Disminución del número de células germinales masculinas Azoospermia Meiosis masculina anormal Morfología anormal de las células germinales masculinas Morfología anormal de espermatogonia Morfología anormal del espermatocono Morfología anormal de espermatoide Arresto de meiosis masculina Apoptosis anormal de celular germinales masculinas
<i>GOPC</i>	Gopc	Golgi associated pdz and coiled-coil motif containing	Espermatogénesis anormal Infertilidad masculina Morfología anormal del núcleo espermático
<i>CLDN11</i>	Cldn11	Claudin 11	Espermatogénesis anormal Infertilidad masculina Azoospermia Morfología anormal de la barrera de células de sertoli
<i>GOLGA3</i>	Golga3	Golgi autoantigen, golgin subfamily a 3	Morfología testicular anormal Espermatogénesis anormal Infertilidad masculina Espermatogénesis anormal Oligospermia Disminución del número de células germinales masculinas

Gen**Ortólogo****Nombre****Fenotipo reportado**

			Azoospermia
			Apoptosis anormal de celular germinales masculinas
<i>PATZ1</i>	Patz1	Poz (btb) and at hook containing zinc finger 1	Arresto de espermatogénesis
			Infertilidad masculina
			Proliferación anormal de la espermatogonia
			Azoospermia
<i>*DMC1</i>	Dmc1	DNA meiotic recombinase 1	Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Gametogénesis anormal
			Espermatogénesis anormal
			Disminución del número de células germinales masculinas
			Azoospermia
			Meiosis masculina anormal
			Morfología anormal del espermatocito
			Arresto de meiosis masculina
<i>VRK1</i>	Vrk1	Vaccinia related kinase 1	Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Proliferación anormal de la espermatogonia
			Disminución del número de células germinales masculinas
			Azoospermia
			Morfología anormal de espermatide
			Arresto de meiosis masculina
<i>CSNK2A1</i>	Csnk2a2	Casein kinase 2, alpha prime polypeptide	Infertilidad masculina
			Oligospermia
			Morfología anormal de espermatide
			Apoptosis anormal de celular germinales masculinas
			Morfología anormal del núcleo espermático
<i>SMPD3</i>	Smpd3	Sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral	Espermatogénesis anormal
			Desarrollo testicular anormal
<i>AQP8</i>	Aqp8	Aquaporin 8	Espermatogénesis anormal
<i>EHD4</i>	Ehd4	Eh-domain containing 4	Espermatogénesis anormal
			Oligospermia

Gen**Ortólogo****Nombre****Fenotipo reportado**

			Disminución del número de células germinales masculinas
			Morfología anormal de espermatide
			Apoptosis anormal de celular germinales masculinas
<i>DBP</i>	Hsd17b4	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	Morfología testicular anormal
			Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Gametogénesis anormal
			Morfología anormal de las células germinales masculinas
			Morfología anormal de espermatide
<i>SETX</i>	Setx	Senataxin	Infertilidad masculina
			Espermatogénesis anormal
			Azoospermia
			Meiosis masculina anormal
			Arresto de meiosis masculina
			Apoptosis anormal de celular germinales masculinas
<i>P2RX1</i>	P2rx1	Purinergic receptor p2x, ligand-gated ion channel, 1	Infertilidad masculina
			Azoospermia
<i>GNRHR</i>	Gnrhr	Gonadotropin releasing hormone receptor	Morfología testicular anormal
			Arresto de espermatogénesis
			Infertilidad masculina
			Gametogénesis anormal
			Oligospermia
			Morfología anormal del espermatocito
			Arresto de meiosis masculina
<i>SFI</i>	Nr5a1	Nuclear receptor subfamily 5, group a, member 1	Morfología de glándulas sexuales anormal
			Morfología testicular anormal
			Arresto de espermatogénesis
			Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Oligospermia

Gen**Ortólogo****Nombre****Fenotipo reportado**

			Desarrollo testicular anormal
			Disminución del número de células germinales masculinas
			Morfología anormal de espermátide
			Nivel de testosterona anormal
<i>YBX3</i>	Ybx3	Y box protein 3	Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Oligospermia
<i>KITLG</i>	Kitl	Kit ligand	Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Migración anormal de las células germinales primordiales
			Células germinales ausentes
			Disminución del número de células germinales masculinas
			Azoospermia
			Proliferación anormal de células primordiales
			Morfología anormal de células germinales primordiales
			Disminución del número de células germinales primordiales
			Disminución de la proliferación de células germinales primordiales
<i>PARP11</i>	Parp11	Poly (adp-ribose) polymerase family, member 11	Infertilidad masculina
			Espermatogénesis anormal
			Morfología anormal de espermátide
			Morfología anormal del núcleo espermático
<i>ARHGDIB</i>	Arhgdib	Rho, gdp dissociation inhibitor (gdi) beta	Espermatogénesis anormal
<i>VDR</i>	Vdr	Vitamin d (1,25-dihydroxyvitamin d3) receptor	Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Gametogénesis anormal
			Fertilidad/fecundación anormal
			Oligospermia
<i>RNF8</i>	Rnf8	Ring finger protein 8	Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Oligospermia

Gen**Ortólogo****Nombre****Fenotipo reportado**

			Azoospermia
			Morfología anormal de espermatogonia
			Morfología anormal del espermatocito
			Morfología anormal de espermatide
<i>MLH1</i>	Mlh1	Mutl homolog 1	Apoptosis anormal
			Infertilidad masculina
			Oligospermia
			Azoospermia
			Meiosis masculina anormal
			Arresto de meiosis masculina
			Espermatogénesis anormal
			Oligospermia
			Morfología anormal del espermatocito
<i>SPACA1</i>	Spaca1	Sperm acrosome associated 1	Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Morfología anormal de espermatide
<i>EGR1</i>	Egr1	Early growth response 1	Infertilidad masculina
			Oligospermia
<i>RDH10</i>	Rdh10	Retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	Espermatogénesis anormal
			Fisiología anormal del sistema reproductor masculino
			Morfología anormal de espermatogonia
			Arresto de meiosis masculina
<i>*TEX14</i>	Tex14	Testis expressed gene 14	Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Gametogénesis anormal
			Desarrollo anormal de células de Sertoli
			Morfología anormal del espermatocito
			Arresto de meiosis masculina
<i>AHR</i>	Ahr	Aryl-hydrocarbon receptor	Disminución de células germinales
			Apoptosis anormal de celular germinales masculinas

Gen**Ortólogo****Nombre****Fenotipo reportado**

<i>PIWIL1</i>	Piwil1	Piwi-like rna-mediated gene silencing 1	Arresto de espermatogénesis Infertilidad masculina Azoospermia Morfología anormal de las células germinales masculinas Morfología anormal de espermatide Arresto de meiosis masculina
<i>HSPA2</i>	Hspa2	Heat shock protein 2	Arresto de espermatogénesis Infertilidad masculina Meiosis masculina anormal
<i>SCML2</i>	Scml2	Scm polycomb group protein like 2	Infertilidad masculina Espermatogénesis anormal Azoospermia Morfología anormal de las células germinales masculinas Apoptosis anormal de celular germinales masculinas
<i>GAMT</i>	Gamt	Guanidinoacetate methyltransferase	Infertilidad masculina Oligospermia
<i>NECTIN2</i>	Nectin2	Nectin cell adhesion molecule 2	Infertilidad masculina Espermatogénesis anormal Desarrollo anormal de células de Sertoli Morfología anormal del núcleo espermático
<i>TRIM28</i>	Trim28	Tripartite motif-containing 28	Oligospermia Disminución del número de células germinales masculinas Morfología anormal de espermatide Degeneración testicular
<i>NR1H2</i>	Nr1h2	Nuclear receptor subfamily 1, group h, member 2	Proliferación anormal de la espermatogonia Desarrollo anormal de células de sertoli
<i>SCO1</i>	Kit	Kit proto-oncogene receptor tyrosine kinase	Arresto de espermatogénesis Espermatogénesis anormal Infertilidad masculina Proliferación anormal de la espermatogonia Oligospermia
Gen	Ortólogo	Nombre	Fenotipo reportado

Resultados

			Desarrollo anormal de células de sertoli
			Migración anormal de las células germinales primordiales
			Fisiología anormal del sistema reproductor masculino
			Disminución del número de células germinales masculinas
			Azoospermia
			Morfología anormal de las células germinales masculinas
			Morfología anormal de células germinales primordiales
			Disminución de la proliferación de células germinales primordiales
<i>PUM1</i>	Pum1	Pumilio rna-binding family member 1	Espermatogénesis anormal
			Oligospermia
			Apoptosis anormal de celular germinales masculinas
<i>HNFI1A</i>	Hnf1a	Hnf1 homeobox a	Espermatogénesis anormal
<i>CDK4</i>	Cdk4	Cyclin-dependent kinase 4	Morfología testicular anormal
			Infertilidad masculina
			Fertilidad/fecundación anormal
			Oligospermia
			Desarrollo anormal de células de sertoli
			Fisiología anormal del sistema reproductor masculino
			Azoospermia
<i>ESPL1</i>	Espl1	Extra spindle pole bodies 1, separase	Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
			Morfología anormal de las células germinales masculinas
			Morfología anormal de espermatogonia
			Morfología anormal del espermatocito
			Morfología anormal de espermatide
			Disminución de la proliferación de células germinales primordiales
<i>MNS1</i>	Mns1	Meiosis-specific nuclear structural protein 1	Infertilidad masculina
			Oligospermia
			Morfología anormal de espermatide
<i>ABCG5</i>	Abcg5	Atp binding cassette subfamily g member 5	Espermatogénesis anormal
			Infertilidad masculina
Gen	Ortólogo	Nombre	Fenotipo reportado

<i>MNAT1</i>	Mnat1	Menage a trois 1	Espermatogénesis anormal
<i>ZNF225</i>	Egr1	Early growth response 1	Infertilidad masculina Oligospermia
<i>PHYH</i>	Phyh	Phytanoyl-coa hydroxylase	Morfología anormal de espermatogonia
<i>MSH4</i>	Msh4	Muts homolog 4	Infertilidad masculina Disminución de células germinales Azoospermia Meiosis masculina anormal
<i>HSD17B14</i>	Hsd17b14	Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14	Infertilidad masculina Oligospermia Degeneración testicular
<i>BRD4</i>	Brd4	Bromodomain containing 4	Espermatogénesis anormal
<i>SELP</i>	Selenop	Selenoprotein p	Oligospermia
<i>AGPS</i>	Agps	Alkylglycerone phosphate synthase	Infertilidad masculina Azoospermia
<i>EIF4G3</i>	Eif4g3	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3	Azoospermia Arresto de meiosis masculina Apoptosis anormal de celular germinales masculinas
<i>KRT24</i>	Krt19	Keratin 19	Morfología anormal de espermatide
<i>LIN28A</i>	Lin28a	Lin-28 homolog a (c. Elegans)	Disminución de células germinales Disminución del número de células germinales primordiales
<i>SGPL1</i>	Sgpl1	Sphingosine phosphate lyase 1	Morfología testicular anormal Testiculo pequeño Espermatogenesis anormal Infertilidad masculina Morfología anormal de espermatide Morfología anormal del espermatozooto

Sub-analisis de miRNAs

Los siete (7) miRNAs de sobreexpresión (upregulated) y los 20 miRNAs de infraexpresión (downregulated) se utilizaron en análisis de interactomas separados utilizando la base de datos miRNet (Fan & Xia, 2018), ya que es probable que interfieran con la expresión génica de sus genes diana. La predicción del objetivo de miRNA fue seguida por un análisis de red de interacción y un enriquecimiento para los procesos biológicos de la ontología génica (GO) para los siguientes términos: generación de gametos, regulación positiva de la diferenciación celular, morfogénesis celular involucrada en la diferenciación, maduración del desarrollo, proliferación celular y proceso sexual reproductivo. Este proceso produjo un grupo de 39 genes diana para los 7 miRNAs sobreexpresados (upregulated) (Figura 12 y Tabla 10) y 70 genes diana para los 20 miRNAs infraexpresados (downregulated) (Figura 13 y Tabla 11).

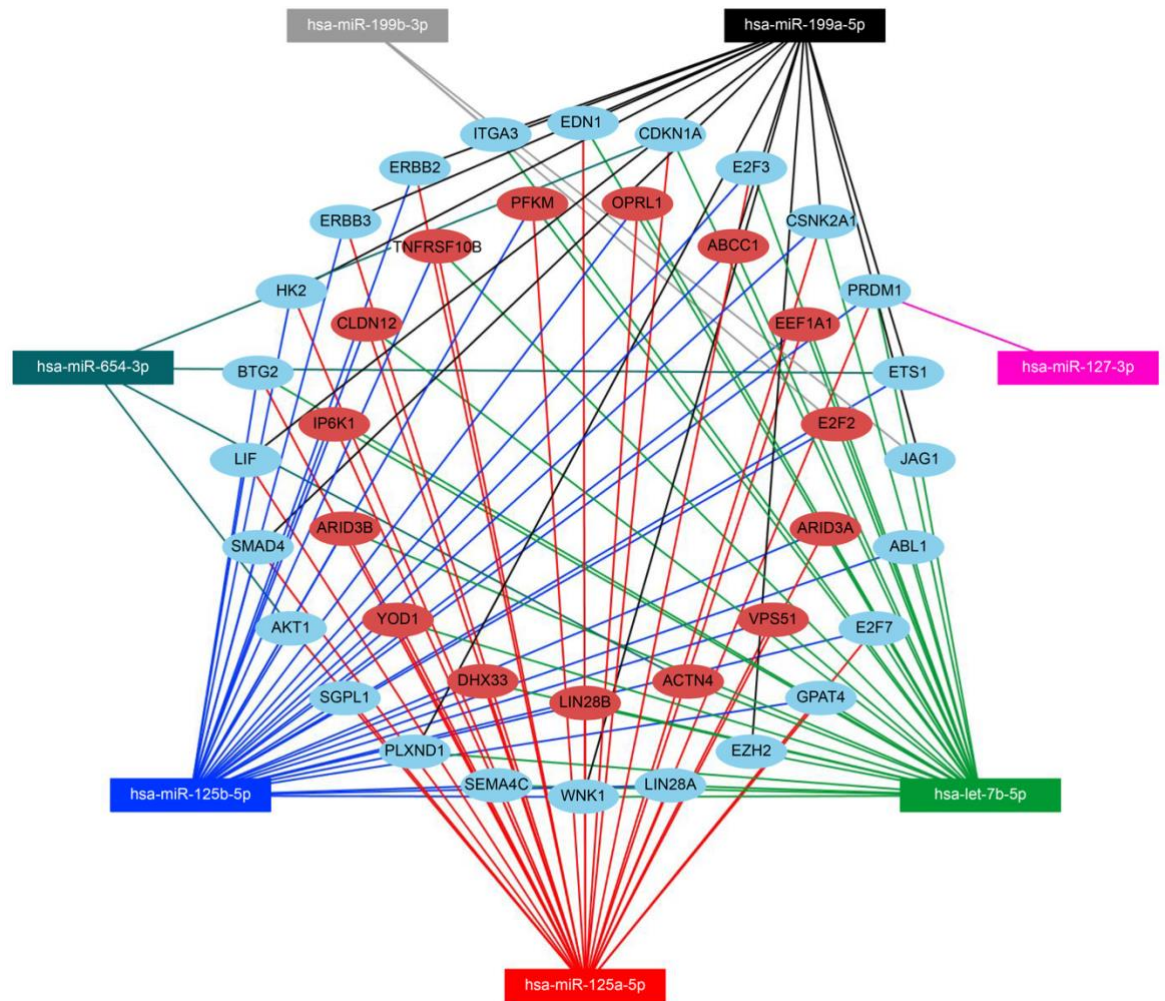


Figura 12. Red de interactoma miRnet para los miRNAs de alta expresión (upregulated) de muestras de pacientes con Síndrome de Klinefelter. Red de interacción entre miRNAs upregulated hsa-miR-654-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, y hsa-miR-199b-3p (cuadrados), con genes diana (óvalos azul y rojo). Los puntos azules representan genes involucrados en diferentes procesos biológicos de interés: diferenciación, proliferación celular, desarrollo del sistema y reproducción.

Tabla 10. Lista de genes diana para los 7 miRNAs, expresados diferencialmente. Del total de 1.960 genes diana, la lista muestra un grupo selecto de 39 genes que según el análisis de interacción con enriquecimiento de procesos biológicos GO podrían estar asociados a alteraciones en la espermatogénesis en el síndrome de Klinefelter.

Gen	Nombre	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-125a-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199b-3p	hsa-miR-654-3p	hsa-miR-127-3p
<i>ABCC1</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	+		+	+			
<i>ABL1</i>	c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	+		+				
<i>ACTN4</i>	actinin alpha 4			+				+
<i>AKT1</i>	thymoma viral proto-oncogene 1	+	+					+
<i>ARID3A</i>	AT rich interactive domain 3A (BRIGHT-like)	+	+	+				
<i>ARID3B</i>	AT rich interactive domain 3B (BRIGHT-like)	+	+	+				
<i>BTG2</i>	BTG anti-proliferation factor 2	+	+	+				
<i>CDKN1A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)		+	+				+
<i>CLDN12</i>	claudin 12	+	+	+				
<i>CSNK2A1</i>	casein kinase 2, alpha 1 polypeptide DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box	+	+	+	+			
<i>DHX33</i>	polypeptide 33	+	+	+				
<i>E2F2</i>	E2F transcription factor 2	+		+		+		
<i>E2F3</i>	E2F transcription factor 3	+	+	+				
<i>E2F7</i>	E2F transcription factor 7	+	+	+				
<i>EDN1</i>	endothelin 1		+	+	+			
<i>EEF1A1</i>	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	+	+	+				
<i>ERBB2</i>	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2	+	+		+			
<i>ERBB3</i>	erb-b2 receptor tyrosine kinase 3	+	+		+			
<i>ETS1</i>	E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain	+			+			+
<i>EZH2</i>	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit			+	+			
<i>GPAT4</i>	glycerol-3-phosphate acyltransferase 4	+	+	+				
<i>HK2</i>	hexokinase 2	+	+		+			
<i>IP6K1</i>	inositol hexaphosphate kinase 1	+	+	+				
<i>ITGA3</i>	integrin alpha 3			+	+	+		
<i>JAG1</i>	jagged 1			+	+	+		
<i>LIF</i>	leukemia inhibitory factor	+	+		+			
<i>LIN28A</i>	lin-28 homolog A (C. elegans)	+	+	+				
<i>LIN28B</i>	lin-28 homolog B (C. elegans)	+	+	+				
<i>OPRL1</i>	opioid receptor-like 1	+	+	+				
<i>PFKM</i>	phosphofructokinase, muscle	+	+	+				
<i>PLXND1</i>	plexin D1	+		+	+			

Resultados

Gen	Nombre	hsa-miR-125b-5p	hsa-miR-125a-5p	hsa-let-7b-5p	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199b-3p	hsa-miR-654-3p	hsa-miR-127-3p
<i>PRDM1</i>	PR domain containing 1, with ZNF domain sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin)	+	+	+				+
<i>SEMA4C</i>	4C	+	+	+				
<i>SGPL1</i>	sphingosine phosphate lyase 1	+	+					
<i>SMAD4</i>	SMAD family member 4	+	+		+			
<i>TNFRSF10B</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	+	+	+				
<i>VPS51</i>	VPS51 GARP complex subunit	+	+	+				
<i>WNK1</i>	WNK lysine deficient protein kinase 1	+		+	+			
<i>YOD1</i>	YOD1 deubiquitinase	+	+	+				

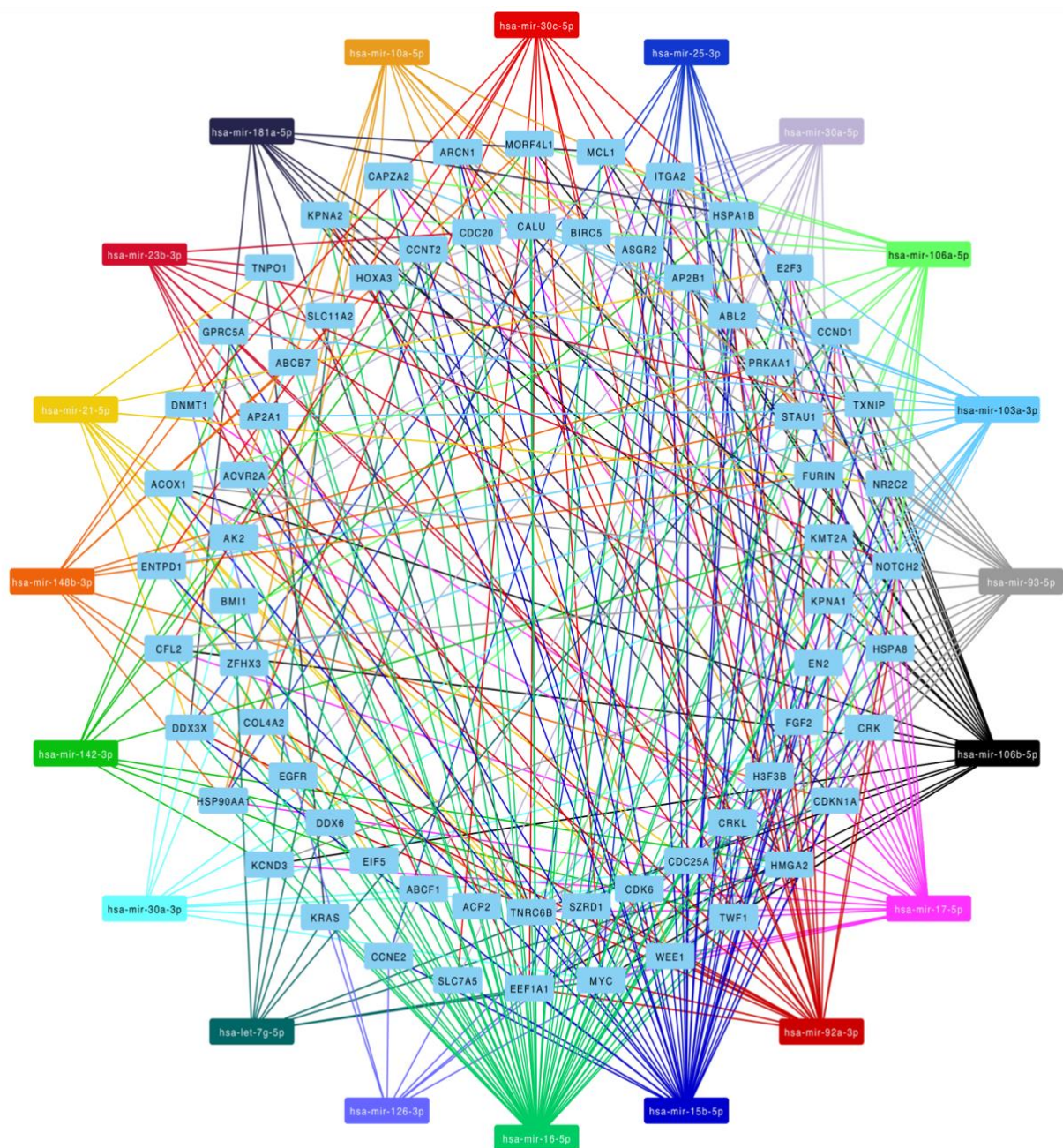


Figura 13. Red de interactoma miRnet para los miRNAs de baja expresión, downregulated de muestras de pacientes con Síndrome de Klinefelter. Red de interacción entre miRNAs downregulated hsa-miR-654-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, y hsa-miR-199b-3p (rectángulos multicolores), con genes diana (rectángulos celestes).

Tabla 11. Lista de genes diana para los 20 miRNAs, expresados diferencialmente. Se muestra la lista de un grupo de 70 genes diana que según el análisis de interacción con enriquecimiento de procesos biológicos GO podrían estar asociados a alteraciones en la espermatogénesis en el Síndrome de Klinefelter.

Gen	Nombre
<i>ABCB7</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7
<i>ABCF1</i>	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1
<i>ABL2</i>	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene 2 (arg, Abelson-related gene)
<i>ACOX1</i>	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl
<i>ACP2</i>	acid phosphatase 2, lysosomal
<i>ACVR2A</i>	activin receptor IIA
<i>AK2</i>	adenylate kinase 2
<i>AP2A1</i>	adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subunit
<i>AP2B1</i>	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit
<i>ARCN1</i>	archain 1
<i>ASGR2</i>	asialoglycoprotein receptor 2
<i>ATOX1</i>	antioxidant 1 copper chaperone
<i>ATP5A1</i>	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1
<i>BCL2</i>	B cell leukemia/lymphoma 2
<i>BDNF</i>	brain derived neurotrophic factor
<i>BIRC5</i>	baculoviral IAP repeat-containing 5
<i>BM11</i>	Bmi1 polycomb ring finger oncogene
<i>CALU</i>	calumenin
<i>CAPZA2</i>	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2
<i>CCND1</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)
<i>CCNE2</i>	cyclin E2
<i>CCNT2</i>	cyclin T2
<i>CDC20</i>	cell division cycle 20
<i>CDC25A</i>	cell division cycle 25A
<i>CDK6</i>	cyclin-dependent kinase 6
<i>CDKN1A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)
<i>CFL2</i>	cofilin 2, muscle
<i>COL4A2</i>	collagen, type IV, alpha 2
<i>CRK</i>	v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog
<i>CRKL</i>	v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like
<i>DDX3X</i>	DEAD box helicase 3, X-linked
<i>DDX6</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6
<i>DNMT1</i>	DNA methyltransferase (cytosine-5) 1
<i>E2F3</i>	E2F transcription factor 3
<i>EEF1A1</i>	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor

Gen	Nombre
<i>EIF5</i>	eukaryotic translation initiation factor 5
<i>EN2</i>	engrailed 2
<i>ENTPD1</i>	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
<i>FGF2</i>	fibroblast growth factor 2
<i>FURIN</i>	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)
<i>GPRC5A</i>	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A
<i>H3F3B</i>	H3.3 histone B
<i>HMGA2</i>	high mobility group AT-hook 2
<i>HOXA3</i>	homeobox A3
<i>HSP90AA1</i>	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1
<i>HSPA1B</i>	heat shock protein 1B
<i>HSPA8</i>	heat shock protein 8
<i>ITGA2</i>	integrin alpha 2
<i>KCND3</i>	potassium voltage-gated channel, Shal-related family, member 3
<i>KMT2A</i>	lysine (K)-specific methyltransferase 2A
<i>KPNA1</i>	karyopherin (importin) alpha 1
<i>KPNA2</i>	karyopherin (importin) alpha 2
<i>KRAS</i>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
<i>MCL1</i>	myeloid cell leukemia sequence 1
<i>MORF4L1</i>	mortality factor 4 like 1
<i>MYC</i>	myelocytomatosis oncogene
<i>NOTCH2</i>	notch 2
<i>NR2C2</i>	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2
<i>PRKAA1</i>	protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
<i>SLC11A2</i>	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2
<i>SLC7A5</i>	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5
<i>STAU1</i>	staufen double-stranded RNA binding protein 1
<i>SZRD1</i>	SUZ RNA binding domain containing 1
<i>TNPO1</i>	transportin 1
<i>TNRC6B</i>	trinucleotide repeat containing 6b
<i>TWFI</i>	twinfilin actin binding protein 1
<i>TXNIP</i>	thioredoxin interacting protein
<i>WEE1</i>	WEE 1 homolog 1 (S. pombe)
<i>ZFX3</i>	zinc finger homeobox 3

Los siete (7) miRNAs upregulated fueron: hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-3p, hsa -miR-654-3p y hsa-miR-127-3p. Los genes diana de estos miRNAs regulados al alza están involucrados en los siguientes procesos

biológicos: proliferación celular (*JAG1*, *PRDM1*, *CDKN1A*, *E2F3*, *EDN1*, *BTG2*, *E2F7*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ETS1*, *LIF*, *SMAD4* y *AKT1*), regulación positiva de la diferenciación celular (*ABL1*, *JAG1*, *PRDM1*, *EDN1*, *EZH2*, *LIN28A*, *ETS1*, *LIF*, *SMAD4* y *AKT1*), regulación positiva de procesos de desarrollo (*ABL1*, *JAG1*, *PRDM1*, *CDKN1A*, *CSNK2A1*, *EDN1*, *ITGA3*, *BTG2*, *PLXND1*, *SEMA4C*, *WNK1*, *EZH2*, *LIN28A*, *GPAT4*, *E2F7*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ETS1*, *HK2*, *LIF*, *SMAD4* y *AKT1*) y procesos reproductivos y generación de gametos (*EDN1*, *LIN28A*, *GPAT4*, *ETS1*, *HK2*, *LIF*, *AKT1* y *SGPL1*). Algunos genes diana participan en procesos biológicos múltiples y se pueden superponer, lo cual habla de coincidencias en los procesos de interés, esto lo representamos en el diagrama de venn (Figura 14). Los genes diana de los 20 miRNAs downregulated (hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-126-3p, hsa -miR-17-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR -15b-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-148b -3p, hsa-miR-93-5p y hsa-miR-181a-5p) también participan en la proliferación celular, la regulación de los procesos de desarrollo, la regulación de la diferenciación celular, el desarrollo de células germinales y gonadal (*ACVR2A*, *CCND1*, *CCNE2*, *HMGA2*, *IMC1*, *HSP90AA1*, *NOTCH2*, *NR2C2* y *BCL2*).

Para realizar un análisis estadístico de los procesos biológicos en los que participan los genes diana de los miRNAs expresados de manera diferencial, realizamos un cálculo de prueba de sobrerrepresentación (over-representation test calculation, plataforma PANTHER) que arrojó valores significativos ($p < 0.05$) para procesos biológicos relacionados con el desarrollo, la diferenciación y procesos implicados en la espermatogénesis, como se muestra en las Figura 15 y 16 y en las Tablas 12 y 13. La participación de genes diana en estos procesos biológicos no es exclusiva, ya que también se observaron diferencias significativas en otros procesos (por ejemplo, regulación del proceso metabólico (GO: 0050789),

regulación de la expresión génica (GO: 0010468), regulación del proceso de desarrollo (GO : 0050793) y proceso apoptótico (GO: 0006915)).

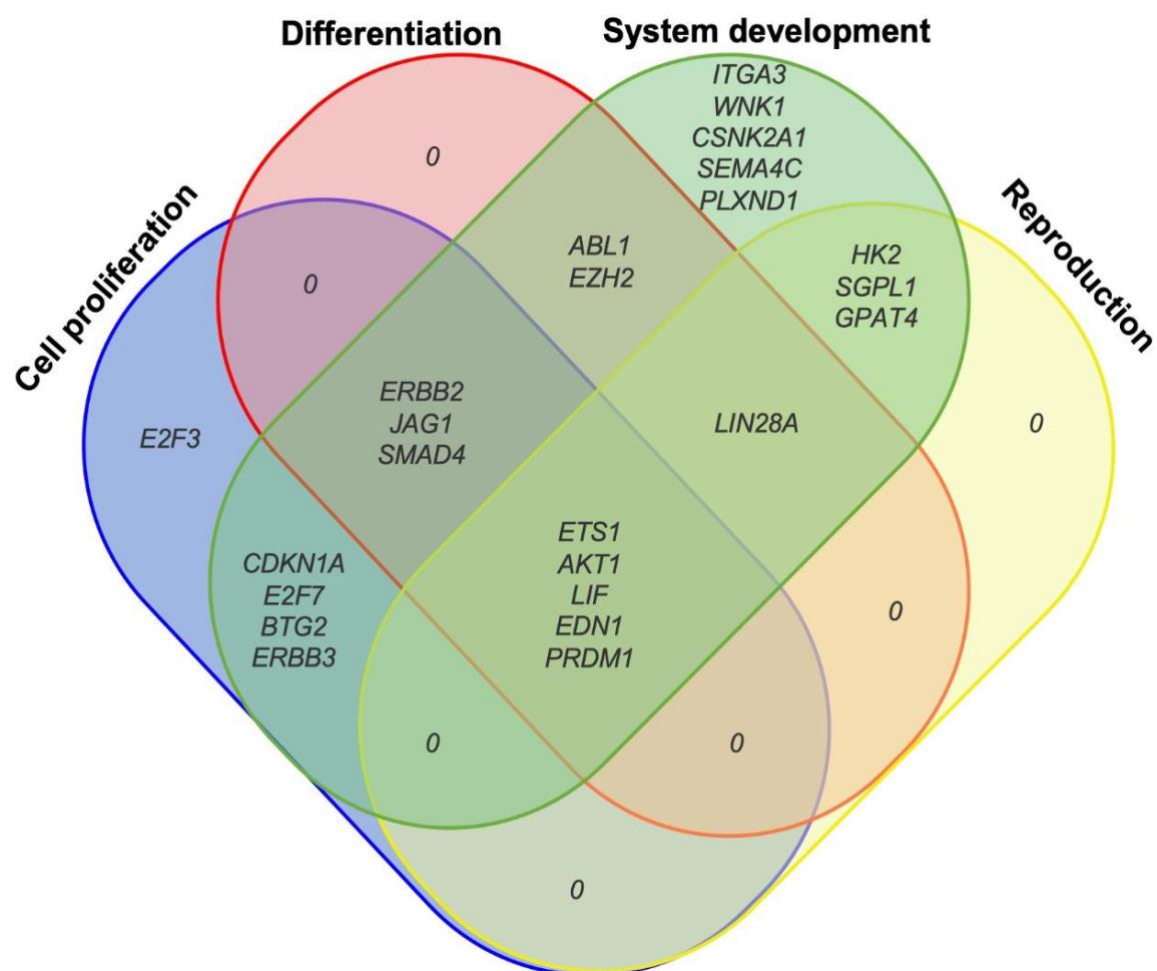


Figura 14. Diagrama de venn de genes diana. Este diagrama muestra la interacción de los genes diana de los miRNAs upregulated que participan en diferentes funciones celulares: diferenciación, proliferación celular, desarrollo del sistema y reproducción.

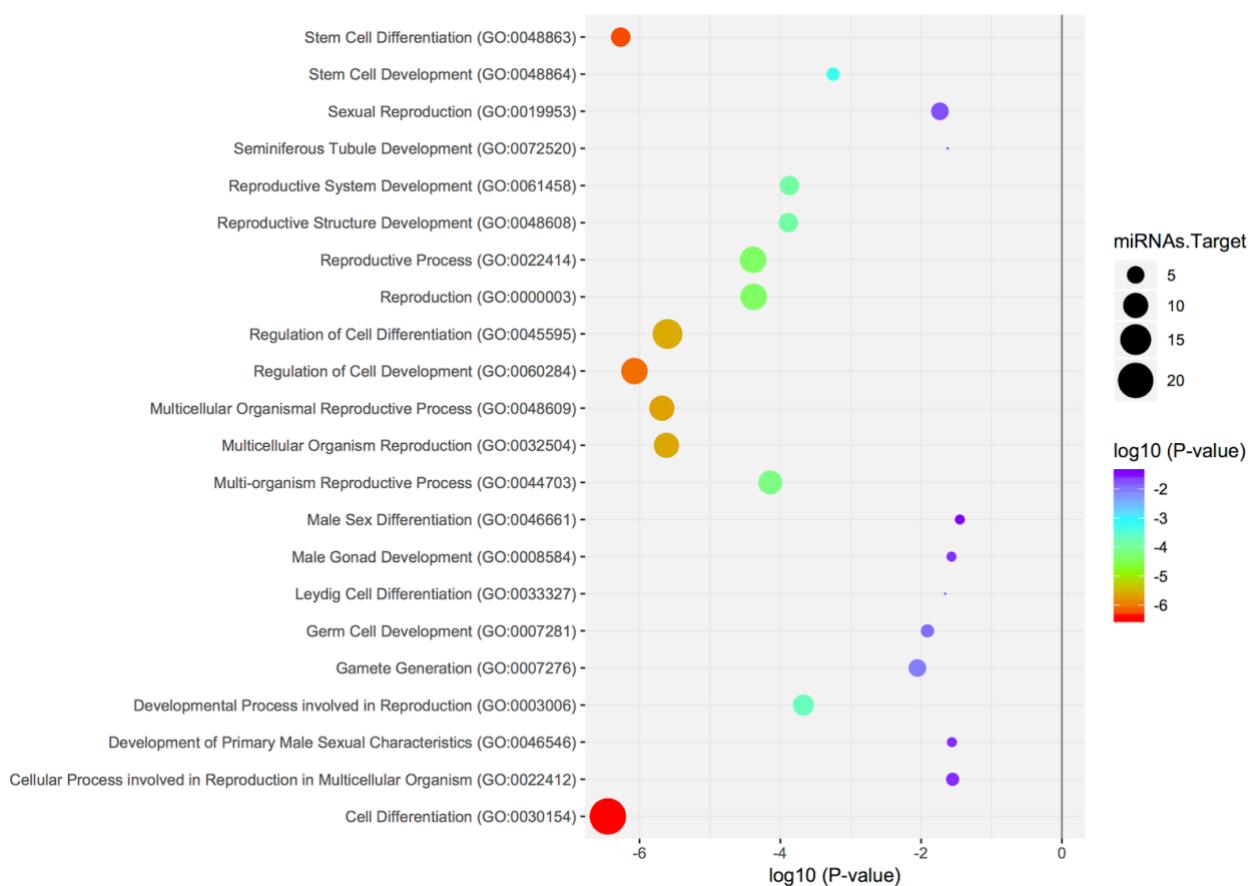


Figura 15. Diagrama de dispersión de los términos GO enriquecidos (scatterplot of enriched GO terms). Este gráfico representa los genes objetivo de los miRNAs upregulated (7) con enriquecimiento de los términos GO, donde el color del círculo indica la significación estadística expresada en valores \log_{10} y el tamaño del círculo representa el número de genes objetivo involucrados.

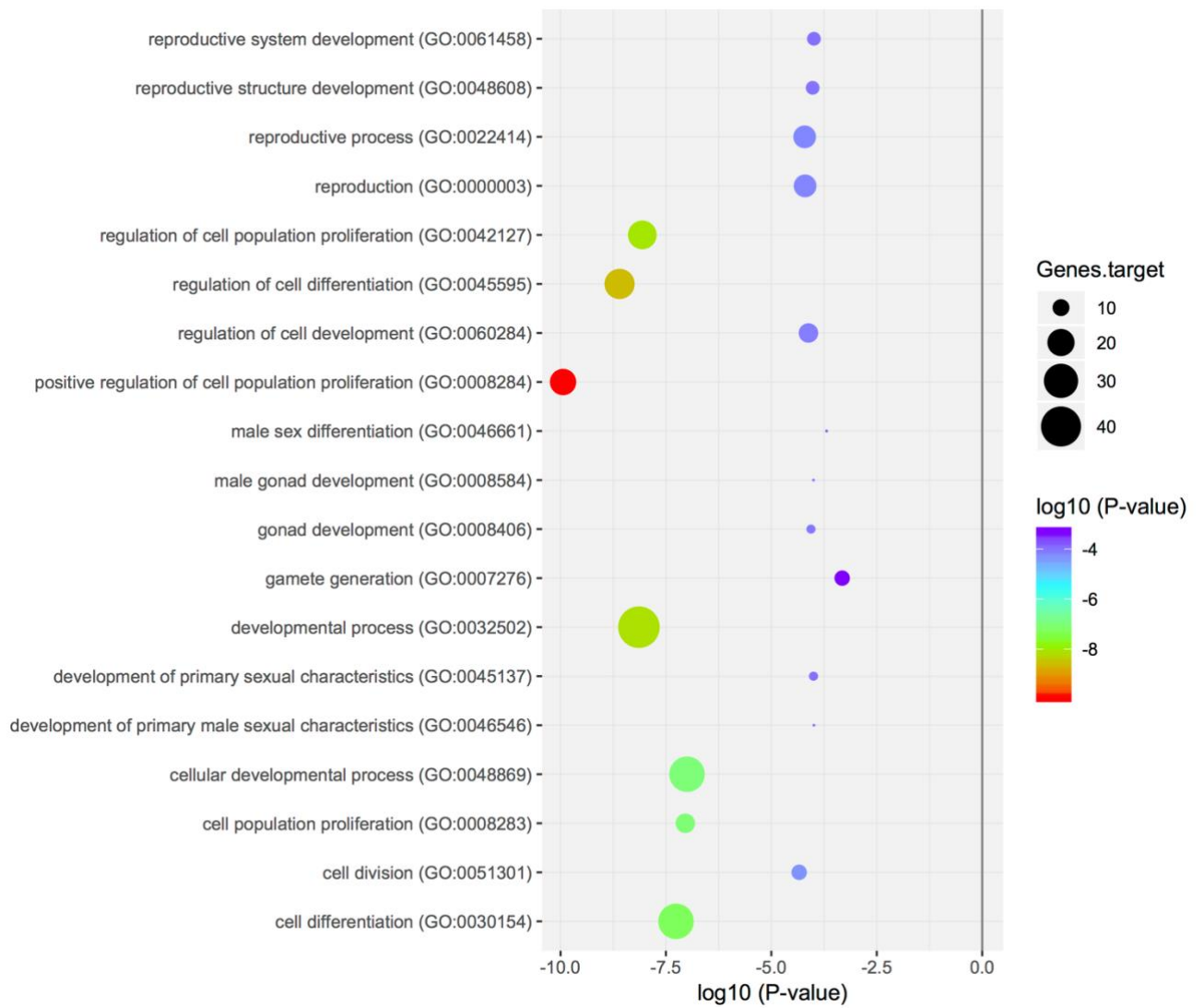


Figura 16. Diagrama de dispersión de los términos GO enriquecidos (scatterplot of enriched GO terms). Este gráfico representa los genes objetivo de los miRNAs downregulated (20) con enriquecimiento de los términos GO, donde el color del círculo indica la significación estadística expresada en valores \log_{10} y el tamaño del círculo representa el número de genes objetivo involucrado.

Tabla 12. Prueba de sobrerrepresentación de términos GO para los 39 genes diana de los 7 miRNAs upregulated de alta expresión en muestras de pacientes con SK. (over-representation test calculation, plataforma PANTHER). Aquí mostramos la lista de procesos biológicos en los que participan los genes diana, de los miRNAs expresados diferencialmente y que están relacionados con el desarrollo gonadal masculino. Los datos se enumeran de acuerdo con la significación estadística.

GO biological process complete	Homo sapiens - REF LIST	miRNAs Target Input	miRNAs Target Input (expected)	miRNAs Target Input (fold Enrichment)	miRNAs Target Input (raw P-value)
Cell Differentiation (GO:0030154)	3703	21	6.88	3.05	3.55E-07
Stem Cell Differentiation (GO:0048863)	158	6	0.29	20.44	5.40E-07
Regulation of Cell Development (GO:0060284)	946	11	1.76	6.26	8.47E-07
Multicellular Organismal Reproductive Process (GO:0048609)	826	10	1.53	6.52	2.08E-06
Multicellular Organism Reproduction (GO:0032504)	840	10	1.56	6.41	2.41E-06
Regulation of Cell Differentiation (GO:0045595)	1814	14	3.37	4.15	2.50E-06
Reproductive Process (GO:0022414)	1426	11	2.65	4.15	4.10E-05
Reproduction (GO:0000003)	1429	11	2.65	4.14	4.18E-05
Multi-organism Reproductive Process (GO:0044703)	995	9	1.85	4.87	7.19E-05
Reproductive Structure Development (GO:0048608)	424	6	0.79	7.62	1.30E-04
Reproductive System Development (GO:0061458)	427	6	0.79	7.56	1.35E-04
Developmental Process involved in Reproduction (GO:0003006)	668	7	1.24	5.64	2.13E-04
Stem Cell Development (GO:0048864)	84	3	0.16	19.23	5.61E-04
Gamete Generation (GO:0007276)	691	5	1.28	3.9	8.87E-03
Germ Cell Development (GO:0007281)	257	3	0.48	6.28	1.23E-02
Sexual Reproduction (GO:0019953)	832	5	1.55	3.24	1.85E-02
Leydig Cell Differentiation (GO:0033327)	11	1	0.02	48.94	2.20E-02
Seminiferous Tubule Development (GO:0072520)	12	1	0.02	44.86	2.38E-02

GO biological process complete	Homo sapiens - REF LIST	miRNAs Target Input	miRNAs Target Input (expected)	miRNAs Target Input (fold Enrichment)	miRNAs Target Input (raw P-value)
Male Gonad Development (GO:0008584)	136	2	0.25	7.92	2.70E-02
Development of Primary Male Sexual Characteristics (GO:0046546)	137	2	0.25	7.86	2.74E-02
Cellular Process involved in Reproduction in Multicellular Organism (GO:0022412)	353	3	0.66	4.58	2.80E-02
Male Sex Differentiation (GO:0046661)	158	2	0.29	6.81	3.55E-02

Tabla 13. Prueba de sobrerrepresentación de términos GO para los 70 genes diana de los 20 miRNAs downregulated de alta expresión en muestras de pacientes con SK. (over-representation test calculation, plataforma PANTHER). Aquí mostramos la lista de procesos biológicos en los que participan los genes diana, de los miRNAs expresados diferencialmente y que están relacionados con el desarrollo gonadal masculino. Los datos se enumeran de acuerdo con la significación estadística.

GO biological process complete	Homo sapiens - REFLIST (20851)	miRNAs Target Input	miRNAs Target Input (expected)	miRNAs Target Input (fold Enrichment)	miRNAs Target Input (raw P-value)
Positive regulation of cell population proliferation (GO:0008284)	921	19	3.05	6.23	1.15E-10
Regulation of cell differentiation (GO:0045595)	1844	24	6.1	3.93	2.50E-09
Developmental process (GO:0032502)	5900	43	19.52	2.2	7.18E-09
Regulation of cell population proliferation (GO:0042127)	1642	22	5.43	4.05	8.65E-09
Cell differentiation (GO:0030154)	3732	32	12.35	2.59	5.54E-08
Cell population proliferation (GO:0008283)	495	12	1.64	7.33	9.07E-08
Cellular developmental process (GO:0048869)	3825	32	12.66	2.53	1.00E-07

GO biological process complete	Homo sapiens - REFLIST (20851)	miRNAs Target Input	miRNAs Target Input (expected)	miRNAs Target Input (fold Enrichment)	miRNAs Target Input (raw P-value)
Cell division (GO:0051301)	503	9	1.66	5.41	4.52E-05
Reproductive process (GO:0022414)	1437	15	4.76	3.15	6.23E-05
Reproduction (GO:0000003)	1440	15	4.77	3.15	6.38E-05
Regulation of cell development (GO:0060284)	964	12	3.19	3.76	7.50E-05
Gonad development (GO:0008406)	214	6	0.71	8.47	8.72E-05
Reproductive structure development (GO:0048608)	431	8	1.43	5.61	9.63E-05
Male gonad development (GO:0008584)	135	5	0.45	11.19	9.95E-05
Development of primary sexual characteristics (GO:0045137)	220	6	0.73	8.24	1.01E-04
Reproductive system development (GO:0061458)	435	8	1.44	5.56	1.02E-04
Development of primary male sexual characteristics (GO:0046546)	136	5	0.45	11.11	1.03E-04
Male sex differentiation (GO:0046661)	158	5	0.52	9.56	2.03E-04
Gamete generation (GO:0007276)	693	9	2.29	3.92	4.81E-04

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El SK es la aneuploidía cromosómica más común en el hombre. Una de las características distintivas del SK es la infertilidad; representan alrededor del 10% de los casos de azoospermia (Gravholt et al., 2018), siendo la causa más común de azoospermia de origen genético.

A pesar de los múltiples estudios que han descrito la historia natural del proceso degenerativo de las células germinales en los pacientes con SK, el o los mecanismos a nivel molecular que inician este proceso, no son bien conocidos.

La mayoría de las teorías propuestas es que se debe a un proceso generado por la alteración en la expresión de los genes que escapan a la inactivación del X. Varios genes localizados en el cromosoma X se expresan en el testículo, por lo cual una dosis génica anormal puede ser parcial o totalmente responsable de la degeneración de las espermatogonias en los pacientes con cariotipo 47,XXY (Pessia et al., 2012; Gravholt et al., 2018). Sin embargo, esta teoría no ha podido ser fundamentada del todo.

También es plausible que el estado aneuploide pueda jugar un papel en la meiosis desordenada y la apoptosis final de estas primeras espermatogonias 47, XXY (Oates, 2012). Recientemente diversos autores han explorado la posibilidad de considerar mecanismos epigenéticos como reguladores de la expresión fenotípica en estos pacientes y no solo la dosis génica de aquellos genes que escapan a la inactivación del X (D'Aurora et al., 2017)(D'Aurora et al., 2017; S. B. Winge et al., 2018).

Diversos autores han buscado encontrar los mecanismos y vías implicadas en el desarrollo del fenotipo en los pacientes con SK a través del análisis de expresión de miRNAs y transcriptoma en células de estos pacientes con SK (Sui et al., 2012; Khazaie & Nasr

Esfahani, 2014; D'Aurora et al., 2015; Cimino et al., 2017), ya que la espermatogénesis es un proceso regulado por la transcripción y el nivel postranscripcional que permite la producción continua de gametos durante la edad adulta. El mecanismo de control postranscripcional mediado por miRNAs ha surgido últimamente como un importante regulador del espermatogénesis (Khazaie & Nasr Esfahani, 2014) Por ello, se podría considerar que la evaluación de los perfiles de expresión de miRNAs en tejido testicular de pacientes con SK puede aportar información que permita entender los mecanismos moleculares, epigenéticos y vías implicadas en la degeneración de las células germinales en estos pacientes.

El presente trabajo realizó un análisis de expresión de miRNAs en tejido de biopsia testicular de pacientes con SK y muestras control de pacientes con azoospermia obstructiva con una espermatogénesis normal en el tejido testicular, mediante el análisis de secuenciación de nueva generación y posteriormente se identificó un perfil de expresión diferencial entre los dos grupos. Además, se determinaron los genes dianas de los miRNAs diferencialmente expresados, que estuvieran relacionados a un fenotipo en mamífero y/o humanos de falla gonadal, alteraciones de la espermatogénesis y anormalidades en las células germinales masculinas a través de diferentes análisis bioinformáticos utilizando análisis de enriquecimiento de los procesos biológicos GO de interés.

Se analizaron 7 muestras de tejido testicular de 4 pacientes con síndrome de Klinefelter y 5 muestras de tejido testicular de pacientes con azoospermia obstructiva como grupo control. Los pacientes se encontraban en un rango de edad de 33-36 años, uno de los pacientes tiene una fórmula cromosómica en mosaico 47, XXY/ 46,XY, el grado de espermatogénesis era en general muy bajo con rangos de 1%-5% y la mayoría del parénquima testicular estudiado mostraba hialinización tubular junto a un patrón de solo células de Sertoli, patrón histológico más frecuente en pacientes de SK en la tercera década de la vida.

Los datos sin procesar se filtraron utilizando un módulo de filtro en un programa interno ACGT101-miR para eliminar lecturas de baja calidad, secuencias adaptadoras 3' y contaminaciones. Las secuencias de datos limpios de ≥ 18 nucleótidos se anotaron en la base de datos de Rfam (<http://www.sanger.ac.uk/software/Rfam>) para eliminar el RNA no codificante (rRNA, tRNA, pnRNA, nsRNA, snRNA, snoRNA) y fragmentos de degradación de RNAm. Las secuencias restantes se alinearon con la base de datos de miRNA, miRbase (Release 21) (<http://www.miRbase.org/>) y las secuencias perfectamente emparejadas se consideraron como miRNA conservados de Homo sapiens. La distribución de las diferentes familias de RNAs identificadas era similar en ambos grupos.

Un total de 3.898 secuencias de miRNAs fueron identificados, 2.479 secuencias reportadas en miRBase y 1.419 no reportadas en miRBase. Un total de 1.598 miRNAs fueron identificados en este estudio. El loci reportado de los miRNAs identificados muestra 243 miRNAs con localización en el cromosoma X, sin embargo, se encontró loci de miRNAs a lo largo de todo el genoma con una distribución similar, por lo que no se observó una expresión preferencial de miRNAs con origen en el cromosoma X en las muestras analizadas.

De acuerdo a la normalización del número de lecturas de secuencias obtenida se estableció una cuantificación relativa y se establecieron niveles de expresión alto en aquellas que mostraban un nivel de expresión por encima del promedio, lo que se encontró en 201 miRNAs, 168 eran secuencias reportadas en miRBase y 33 secuencias novel. En relación a la proporción de miRNAs con un nivel de expresión alto y su loci, sí se observó un mayor número de miRNAs con origen en el cromosoma X. Como se mencionó, los miRNAs se expresan diferencialmente durante la espermatogénesis de ratón (Yan et al., 2007; Buchold et al., 2010). De forma interesante, los miRNAs que se expresan diferencialmente durante la espermatogénesis tienen una distribución cromosómica no aleatorizada; con un

enriquecimiento de miRNAs derivados del cromosoma X, como se observa en las muestras analizadas de ambos grupos y se expresó en la Figura 9 de los resultados.

Liang et al. en 2007, publicaron perfiles de expresión de miRNAs en diferentes tejidos para establecer las diferencias en los perfiles de expresión de miRNAs entre tejidos de individuos sanos y dentro de sus hallazgos describen una expresión preferencial de un cluster de miRNAs localizados en Xq27. Estos autores reportan una lista de miRNAs con un aumento en la expresión en la muestra de testículos (Liang et al., 2007) (hsa-mir-34b, hsa-mir-513-1, hsa-mir-513-2, hsa-mir-507, hsa-mir-510, hsa-mir-449, hsa-mir-449b, hsa-mir-202, hsa-mir-34b, hsa-mir-34c, hsa-mir-506, hsa-mir-508, hsa-mir-509, hsa-mir-514-1, hsa-mir-514-2, hsa-mir-514-3) los cuales también estaban en nuestra lista de miRNAs con sobreexpresión a excepción de hsa-mir-510. Sin embargo, este miRNAs si esta expresado en el grupo de nivel de expresión moderada de nuestro estudio, lo cual nos permite reproducir resultados que incluyen los perfiles previamente descritos en tejido testicular.

De los miRNAs evaluados en nuestro estudio, 1.095 miRNAs tuvieron una expresión media que se definió como al número de lecturas mayor que 10 y menor que la copia promedio del conjunto de datos y 551 miRNAs un nivel de expresión baja definido como un número de lecturas en esos miRNAs inferior a 10.

La expresión diferencial de los miRNAs en función de los recuentos de secuenciación normalizados se analizó mediante el uso selectivo de la prueba t de Student. De acuerdo a estos valores se detectaron 259 miRNAs con expresión diferencial y valores estadísticamente significativos entre los grupos, los cuales se mostraron en la Tabla 6 de los resultados.

De los 259 miRNAs de expresión diferencial, 27 pertenecen al grupo de un nivel alto de expresión con valores de lecturas por encima del promedio. De los 27 miRNAs con nivel

alto de expresión, 20 están infraexpresados (downregulated) con respecto al grupo control y 7 están sobreexpresados (upregulated) con respecto al grupo control reflejado en la Tabla 7.

Diferentes autores han reportado la regulación de los miRNAs en la espermatogénesis (Song et al., 2009; Kotaja, 2014; Grossman & Shalgi, 2016). Los estudios se centran en la diferencia de los miRNAs de acuerdo a las diferentes fases de la espermatogénesis: proliferación mitótica de espermatogonias, meiosis de espermatocitos y diferenciación haploide de espermatidas. Las células madre espermatogonias (CME) provienen de las espermatogonias en los testículos postnatales y a su vez surgen de las células germinales primordiales durante el desarrollo fetal. Las CME se caracterizan por su capacidad de equilibrar divisiones autorrenovables y divisiones diferenciadoras. Este equilibrio mantiene el conjunto de células madre y satisface la demanda proliferativa de los testículos para producir millones de espermatozoides cada día (Phillips et al., 2010).

La espermatogonia diferenciada se somete a divisiones mitóticas posteriores para expandir el número de células germinales diferenciadas. Después de la fase de proliferación, las células germinales inician la profase de meiosis I durante la cual se realiza la recombinación de los cromosomas homólogos (Miller et al., 2013). Posteriormente, los espermatocitos entran a la meiosis II para dividir las cromátides hermanas y generar células haploides, los espermatocitos secundarios dan origen a las espermatidas redondas que a su vez comienzan la fase de espermiogénesis para generar las estructuras específicas del espermatozoide y compactar la cromatina con la ayuda de las protaminas (Kanatsu-Shinohara & Shinohara, 2013). Cada una de estas fases induce un perfil de expresión génica diferente que ya ha sido descrito en modelos animales y humanos (Chalmel et al., 2007; Laiho et al., 2013; Jan et al., 2017; Grive et al., 2019). Se ha demostrado que los RNA no codificantes juegan un papel crítico en el control de la expresión génica, al igual que los RNAm, los RNA no codificantes también están regulados diferencialmente durante la espermatogénesis

(Grossman & Shalgi, 2016) (Kotaja, 2014). En la actualidad, es bien reconocido el papel de los miRNA como factores reguladores que controlan la expresión de una amplia gama de genes que codifican proteínas. Los miRNAs funcionan principalmente después de la transcripción al afectar la estabilidad o la traducción de sus RNAm objetivo (Ghildiyal & Zamore, 2009; Carthew & Sontheimer, 2009). En una revisión de Kotaja, et al., se muestra los principales miRNAs reportados en las diferentes etapas de la espermatogénesis, los cuales se resumen en la Tabla 14 (Kotaja, et al., 2014) y fueron de interés principal en nuestro estudio en busca de un patrón diferencial entre nuestros grupos con respecto a estos miRNAs previamente publicados.

Tabla 14. miRNAs expresados en la espermatogénesis de ratón. (Tomado de Kotaja N 2014)

Estadio celular	miRNAs reportados	Autores
Espermatogonia	miR-291a-5p, -293, -294*, -290-5p	McIver SC, 2012
Espermatogonia no diferenciada	miR-21 Mantenimiento	Niu Z, 2011
	miR-34c, -182, -183, -146a, -465a-3p, -465b-3p, -465c-3p, and -465c-5p	Niu Z, 2011 Niu Z, 2011
	miRNA-20,-106a	He Z, 2013
	miRNA-221/222	Yang Q-E, 2013
Espermatogonia diferenciada	miRNA-146 Inhibición de la diferenciación mediada por Ac. Retinoico	Huszar JM, 2013
	let-7f, -7a, -7b, -c7, -7g, -7i, miR-136, -743a, -463	Smorag L, 2012 McIver SC, 2012
	miR-99a, -34a, -322, -201, -547, -204	
	Diferenciación mediada por Ac. Retinoico	Tong M-H, 2011
	let-7a, -7b, -7c, -7d, -7e, 7g	
Espermatocito	miR-15b, -34b-5p, -34b-3p, -34c, -34c, -449a, -425, miR-99a, -34a, -322, -201, -547, -204 -375, -3470a, -18a, -296-5p, -466i-5p, -3085-5p	Smorag L, 2012
Espermatocito primario a espermátida redonda	miR-464, -t13, -t12, -t20, -t8, -t14, -t17, -469, -t3	Ro S, 2007
	miR-34c Inducción de la apoptosis	Liang X, 2012

Tong et al. en 2011 describieron resultados de experimentos en ratón que sugieren que los miRNAs *Mirlet7* desempeñan un papel crítico en la proliferación y diferenciación espermatogonial a través de la selección de genes clave (Tong et al., 2011). Posteriormente, en 2014 Werler et al. mediante un estudio con el modelo de ratón del SK (41,XXY), propone una hipótesis para la generación de la azoospermia en los pacientes, encontrando que los individuos ya nacen con un número reducido de espermatogonias, y en consecuencia, al nacer, hay un número reducido de células germinales que expresan marcadores de célula madre espermatogonia. Además, este potencial autopropagador se pierde durante la diferenciación mitótica y cuando las células germinales entran en la meiosis, hasta que finalmente se agotan perdiendo esta capacidad de autorenovación de las CME (Werler et al., 2014). Usando el modelo de ratón 41, XXY, los autores de este estudio analizaron la expresión de *LIN28A* y sus miRNA asociados, ya que se ha demostrado que *LIN28A* no solo es esencial para el desarrollo exitoso de las células germinales primordiales, sino que también marca la célula madre espermatogonia en ratones durante toda su vida (Zheng et al., 2009). *LIN28A* es una proteína de unión a RNA que se expresa altamente en células madre embrionarias de ratón pluripotentes (Moss & Tang, 2003) y se expresa específicamente en espermatogonias indiferenciadas en el ratón. Epigenéticamente, la expresión de *LIN28A* está regulada por los miRNAs 125a y 125b, los cuales son miRNAs conservados que se encuentran en la región no traducida (UTR) de *Lin28a*, de modo que un aumento en miR-125b da como resultado la regulación negativa de los transcritos de *Lin28a*. Esta regulación negativa implica la reducción tanto de la eficiencia traduccional como de la abundancia de RNAm (Wu & Belasco, 2005).

LIN28A a su vez regula otros miRNAs de la familia let-7 (Wu & Belasco, 2005). *LIN28A* inhibe la biosíntesis de los miRNAs de la familia let-7 debido al bloqueo de primRNAs en miRNAs maduros y este ciclo de retroalimentación entre *LIN28A* y la familia

let-7. La inducción de let-7 por la disminución de los niveles de *LIN28A* inhibe la autorrenovación de las células no diferenciadas (CEM) y promueve la diferenciación (Melton & Blelloch, 2010; Thornton, et al., 2012).

En el trabajo de Werler et al. se informó que la pérdida de células germinales se asocia con la disminución de la expresión de *Lin28a*, estos resultados fueron evaluados en un modelo de ratón de SK. Observaron que en el grupo control la expresión de *Lin28a* estuvo presente desde el día 1 de nacimiento y aumentó durante el desarrollo postnatal hasta el día 14 y se redujo después en la edad adulta. Los autores explican que esto es debido al creciente número de células espermatogonias diferenciadas en relación a las CEM. En relación a esto, se observó una expresión elevada de hsa-mir-125 en el día 1, comenzando a disminuir en el día 3 y se redujo aún más desde el día 5 en adelante, de acuerdo a lo reportado en la función de este miRNA como un regulador negativo de *Lin28A*, además, los miRNAs de la familia let-7, y en los controles se encontró una disminución en la expresión de let-7g que va en relación a los niveles crecientes de expresión de *Lin28a*. De manera interesante en los ratones 41,XXY, solo se observó una expresión de RNAm de *Lin28a* muy débil desde el día 1 hasta 14 y una ausencia completa de expresión en animales adultos. En consecuencia, los miRNAs reguladores miR-125b y let-7g estaban completamente desregulados en el testículo del modelo 41,XXY, aunque la expresión de *Lin28a* casi no existe desde el día 1 a 10, en la edad adulta la expresión de ambos miRNAs se aumentó (Werler et al., 2014). En nuestro estudio, se observó una elevación en los niveles de expresión de hsa-mir-125b y hsa-mir-125a con diferencia significativa con respecto al grupo control, también hubo un aumento en la expresión estadísticamente significativo en hsa-let-7b, y diferencia entre los grupos en hsa-let-7g pero aquí se mostró una disminución de la expresión de este miRNA en el grupo de pacientes con SK.

Se han implicado varios miRNAs en la regulación de las CEM, entre ellos están miR-21, miR-20 y miR-106a, que son expresado preferentemente por CEM (Niu et al., 2011; He et al., 2013). De forma interesante, Niu et al. refieren que la inhibición de miR-21 aumentó el número de células germinales que iniciaron apoptosis (Niu et al., 2011). En nuestro análisis hsa-mir-21, se encontró con una subexpresión con respecto al grupo control en las muestras de pacientes con SK, que pudiera estar involucrado en los procesos de apoptosis de las células germinales. La sobreexpresión de miR-20 y miR-106 aumentó la tasa de proliferación de las CEM en el estudio de He (He et al., 2013). Nuestros hallazgos muestran un nivel de expresión muy bajo en ambos miRNAs y con diferencias significativas entre ambos grupos lo que sugiere una tasa de proliferación de las CEM disminuida en los pacientes con SK.

Bao, et al. analizaron mediante el uso de microarreglos y ensayos qPCR los miRNAs del cluster miR-449 y miR-34b, miR-34c se expresaban preferentemente en los testículos de ratón y sus niveles de expresión aumentaban al inicio de la meiosis durante el desarrollo testicular y en la espermatogénesis del adulto. El patrón de expresión del grupo miR-449 se parecía al del miRNAs-34b /c durante la espermatogénesis. Por lo cual los autores concluyen que ambos clusters funcionan de forma redundante en la regulación del desarrollo de células germinales masculinas en los testículos (Bao et al., 2012). Los niveles de expresión en nuestros análisis presentan una disminución de los niveles de expresión para miR-34c, miR-34b y de forma interesante no hubo expresión de los miR-449c ni miR-449b en el grupo de pacientes con SK.

Zhou, et al. han informado que la regulación post-transcripcional mediada por *Nanos2* es esencial para la homeostasis de las CEM en modelos murinos. *Nanos2* mantiene la homeostasis de CEM mediante la represión transcripcional de los RNAm relacionados con la diferenciación y el secuestro de la proteína mTOR (Zhou et al., 2015). De acuerdo a este trabajo, Huang, et al. analizaron la relación de *Nanos2* y miR-34c, tanto el efecto de la

sobreexpresión como el de la inhibición de miR-34c en la expresión de Nanos2 en las células germ cell-1 (GC-1) línea celular que muestra las características de una etapa entre las espermatogonias de tipo B y los espermatoцитos primarios. Además, se examinaron los niveles de expresión de miR-34c y Nanos2 en tejido testicular de humanos y ratones con criptorquidia. Los autores concluyeron que miR-34c podría inhibir la expresión de Nanos2 en las células GC-1. miR-34c disminuyó significativamente en los tejidos testiculares de pacientes con criptorquidia, así como en el modelo murino de criptorquidia inducido por cirugía. El western blot reveló que el nivel de proteína de Nanos2 tenía una correlación negativa con la expresión de miR-34c. La expresión anormal de miR-34c / Nanos2 interrumpió el equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación de CEM, y finalmente generó un efecto negativo en la espermatogénesis de los testículos con criptorquidia (Huang et al., 2018).

Yang QE, *et al.* reportaron que miR-221/222 desempeña un papel crucial en el mantenimiento del estado indiferenciado de la espermatogonía a través de la represión de la expresión del gen *KIT* (Yang et al., 2013). La autorrenovación de las CEM mantiene un grupo constante del que surgirán y se multiplicarán los progenitores antes de comprometerse con una vía de diferenciación terminal (Phillips et al., 2010). Una característica distintiva de la transición a un estado diferenciado en la espermatogonía de mamíferos es el logro de la expresión del receptor KIT. La expresión de la proteína KIT está ausente en la espermatogonía indiferenciada y se vuelve detectable por primera vez en la superficie de la espermatogonía diferenciada y persiste hasta la etapa de leptoteno del desarrollo de los espermatoцитos (Yoshinaga et al., 1991).

Yang et al. demostraron que los factores de crecimiento que promueven el mantenimiento de la espermatogonía indiferenciada aumentan la expresión de miR-221/222; mientras que la exposición al ácido retinoico, un inductor de la diferenciación de la

espermatoogonia, regula negativamente la abundancia de miR-221/222 (Yang et al., 2013). En relación a la histología de las muestras analizadas en nuestros pacientes con SK, el nivel de focos activos de espermatoogénesis eran muy pocos, por lo cual lo esperado es un nivel casi ausente de CEM y base a esto, estos miRNAs, no mostrarían un nivel de expresión alta. Observamos una baja expresión de estos miRNAs en ambos grupos con una infraexpresión en las muestras de SK, sin embargo, no fue significativo estadísticamente la diferencia entre ambos grupos.

Los miRNAs del grupo nivel alto de expresión y con una expresión diferencial (up/down regulated) de forma estadísticamente significativa, fueron seleccionados para un sub análisis de redes de interacción y genes diana de estos miRNAs. Los miRNAs seleccionados con sobreexpresión (upregulated): hsa-miR-654-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-199b-3p y fueron analizados con la base miRnet (Fan et al., 2016; Fan & Xia, 2018), la cual integra la información de once bases de datos de miRNAs diferentes: TarBase, miRTarBase, miRecords, miRanda, miR2Disease, HMDD, PhenomiR, SM2miR, Pharmaco-miR, EpimiR y StarBase. Posteriormente se realizó un análisis de enriquecimiento a los genes diana para determinar participación en los procesos biológicos de acuerdo a la ontología de genes (GO) (<http://www.geneontology.org>), la cual es una importante iniciativa bioinformática para unificar la representación de los atributos de los productos genéticos en todas las especies. La ontología de genes define el universo de conceptos relacionados con las funciones de los genes ('términos GO'), y cómo estas funciones se relacionan entre sí ('relaciones'). Se revisa y amplía constantemente a medida que se acumula el conocimiento biológico. El GO describe la función con respecto a tres aspectos: función molecular (actividades a nivel molecular realizadas por productos genéticos), componente celular (las ubicaciones relativas a las estructuras celulares en las que un producto génico desempeña una función) y proceso

biológico (los procesos más grandes, o 'programas biológicos' realizados por múltiples actividades moleculares).

Más específicamente, el proyecto apunta a: 1) mantener y desarrollar su vocabulario controlado de las funciones o vías relacionadas de productos génicos y proporcionar herramientas para acceder fácilmente a todos los aspectos de los datos proporcionados por el proyecto, para permitir la interpretación funcional de los datos experimentales.

Se realizó una Red de interacción y análisis de predicción de objetivos de miRNA, que se muestra en las Figuras 12 y 13. Los genes diana de estos miRNAs regulados al alza están involucrados en los siguientes procesos biológicos: proliferación celular (*JAG1*, *PRDM1*, *CDKN1A*, *E2F3*, *EDN1*, *BTG2*, *E2F7*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ETS1*, *LIF*, *SMAD4* y *AKT1*), regulación positiva de la diferenciación celular (*ABL1*, *JAG1*, *PRDM1*, *EDN1*, *EZH2*, *LIN28A*, *ETS1*, *LIF*, *SMAD4* y *AKT1*), regulación positiva de procesos de desarrollo (*ABL1*, *JAG1*, *PRDM1*, *CDKN1A*, *CSNK2A1*, *EDN1*, *ITGA3*, *BTG2*, *PLXND1*, *SEMA4C*, *WNK1*, *EZH2*, *LIN28A*, *GPAT4*, *E2F7*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ETS1*, *HK2*, *LIF*, *SMAD4* y *AKT1*) y procesos reproductivos y generación de gametos (*EDN1*, *LIN28A*, *GPAT4*, *ETS1*, *HK2*, *LIF*, *AKT1* y *SGPL1*). Algunos genes diana participan en procesos biológicos múltiples y se pueden superponer por lo cual habla de coincidencias en los procesos de interés esto lo representamos en el diagrama de venn (Figura 14). De acuerdo a nuestra revisión en la literatura, se discute sobre las publicaciones que asocian la función de estos genes en la espermatogénesis.

El protooncogen *ABL1* localizado en 9q34.2 codifica una proteína tirosina quinasa citoplasmática y nuclear que se ha implicado en procesos de diferenciación celular, división celular, adhesión celular y respuesta al estrés (Barilá & Superti-Furga, 1998; Fan et al., 2016). Los ratones homocigotos para las mutaciones en el gen *Abl1* muestran una mayor mortalidad

perinatal, fertilidad reducida, cráneo acortado y defectos en la maduración de las células B en la médula ósea (Schwartzberg et al., 1991), recientemente Kui *et al.* publicaron un metanálisis del perfil de expresión génica en muestras de tejido testicular humano con alteraciones en la fertilidad y comunicaron los genes candidatos para parada en la espermatogénesis, entre ellos se incluye *ABL1*, sin embargo aún no se tiene claro su mecanismo, que posiblemente sea en relación a una detención del ciclo celular (Kui et al., 2019).

Jagged-1(JAG1) es un ligando del receptor Notch, y su unión desencadena una cascada de escisión proteolítica que eventualmente conduce a la liberación de la parte intracelular del receptor desde la membrana, lo que le permite translocarse al núcleo y activar factores de transcripción que juegan papeles clave en la diferenciación celular y la morfogénesis (Guarnaccia et al., 2004; Kui et al., 2019). También se ha descrito que es gen diana de miR-34a y miR21, (Guarnaccia et al., 2004; Hashimi et al., 2009; Kui et al., 2019) los cuales discutimos previamente por las publicaciones de su papel regulador en la diferenciación de las espermatogonias (Niu et al., 2011). Además, recientemente Parekh, *et al.*, indicaron que en los testículos de ratón las células germinales inducen la activación de *NOTCH* en las células de Sertoli a través de *JAG1*, desencadenan su propia diferenciación a través de la regulación negativa de la producción de *CYP26B1*. Por el contrario, cuando las células germinales no producen *JAG1* funcional, la vía NOTCH no se activa, *CYP26B1* está presente y las células germinales permanecen indiferenciadas (Parekh et al., 2019). De forma interesante, *NOTCH2*, un receptor NOTCH importante durante la diferenciación de las células de Leydig (C. Liu et al., 2016), es un gen objetivo de algunos de los miRNAs downregulated (hsa-mir-16-5p, hsa-mir-17-5p, hsa-mir-92a-3p, hsa- mir-106a-5p, hsa-mir-181a-5p, hsa-mir-15b-5p y hsa-mir-23b-3p).

PRDM1 es un represor transcripcional de unión a DNA. Esta función la lleva a cabo a través del reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas (Smith et al., 2010).

Tiene un papel crítico en el desarrollo de las células germinales de ratón, ya que al ser inhibido provoca un bloqueo temprano en el proceso de formación de células germinales primordiales. Los embriones mutantes deficientes de *PRDM1* forman unas pocas células primordiales similares a las células germinales, que no muestran la migración característica, proliferación y represión constante de genes homeobox que normalmente se presentan en células germinales primordiales (Ohinata et al., 2005; Smith et al., 2010).

CSNK2A1 es una serina-treonina quinasa independiente de calcio que se compone de dos subunidades catalíticas alfa y dos subunidades beta reguladoras. *Csnk2a2* se expresa preferentemente en las últimas etapas del espermatogénesis, y los ratones machos en los que se ha interrumpido *Csnk2a2* son infértiles, con oligospermia y globozoospermia (Xu et al., 1999).

EDN1 es un gen que codifica una preproteína que se procesa proteolíticamente para generar un péptido secretado que pertenece a la familia de endotelina / sarafotoxina (Inoue et al., 1989). *EDN1* y Adrenomodulina (ADM) tienen efectos opuestos sobre los niveles entre sí en las células de Sertoli, lo que sugiere la presencia de un mecanismo regulador local formado por *ADM* y *EDN1* en los testículos de rata. La mayor parte del *EDN1* en el testículo de rata es producido por células de Sertoli, mientras que los receptores de *EDN* son abundantes en las células de Leydig y en las células mioideas peritubulares, *ADM* y *EDN1* pueden por lo tanto interactuar para regular la producción de inhibina B en las células de Sertoli. Los autores de este estudio sugieren que *ADM*, a través de su control en la secreción de inhibina B, puede desempeñar un papel en la regulación del espermatogénesis (Chan et al., 2008).

El gen *BTG2* codifica una proteína antiproliferativa involucrada en la regulación de la transición G1 / S del ciclo celular (Duriez et al., 2002). BTG1 y BTG2 son proteínas de los vertebrados, que pueden suprimir la proliferación o promover la diferenciación. Ellas interactúan en un dominio esencial para la actividad de FOG-3, un complejo regulador transcripcional que se ha conservado en todos los eucariotas. En un modelo de *C. Elegans* se observó que FOG-3 controla la transcripción de genes necesarios para que las células germinales inicien la espermatogénesis (Chen et al., 2000).

La proteína *WNK1* pertenece a una familia de serina / treonina quinasa (WNK) sin lisina (K), estas quinastas poseen funciones importantes en la homeostasis iónica. Se ha demostrado que WNK1 tiene diferentes isoformas. En los tejidos de ratones adultos, los perfiles de expresión muestran una expresión abundante y exclusiva de los tejidos nerviosos, riñón, timo y testículo (Chen et al., 2000; Shekarabi et al., 2013). Sin embargo, su función aun no es clara o no se encuentran publicaciones con relación a la espermatogenesis.

La proteína Lin28A contiene una combinación conservada de motivos de unión a RNA (Moss & Tang, 2003). Wu y Belasco mostraron que el RNAm de LIN28 humano es un objetivo de los miRNAs miR-125b y miRNA-125a (Wu & Belasco, 2005). Se ha demostrado que LIN28A no solo es esencial para el desarrollo exitoso de las células germinales primordiales, sino que también marca la espermatogonia indiferenciada en ratones a lo largo de su vida (Wu & Belasco, 2005; West et al., 2009; Zheng et al., 2009). LIN28A es una proteína que se expresa en células madre embrionarias de ratón pluripotentes (Moss & Tang, 2003; Aeckerle et al., 2012), se discute como un marcador de CEM en primates (Aeckerle et al., 2012) y se expresa específicamente en espermatogonias indiferenciadas en el ratón.

GPAT4 pertenece a un grupo de aciltransferasas del ácido lisofosfatídico que catalizan la conversión del ácido lisofosfatídico (LPA) en ácido fosfatídico (PA). LPA y PA están involucrados en la transducción de señales y la biosíntesis de lípidos. La mayor expresión se encontró en el músculo esquelético, el corazón y los testículos. LPA es un mitógeno que media múltiples procesos celulares, incluida la proliferación celular. El gen *GPAT4* se expresó abundantemente en espermátocitos y alrededor de las espermátidas durante la meiosis, pero no en las espermátidas alargadas durante la espermiogénesis posterior. Las células germinales mostraron un marcado aumento en la proliferación después de la transfección con *GPAT4*; El análisis del ciclo celular mostró una disminución en el porcentaje de células en la fase G0 / G1 y un aumento en la fase S. Por lo tanto, *GPAT4* podría desempeñar un papel importante en la espermatogénesis, especialmente en la meiosis media (Qiu et al., 2009).

ERBB2 es un gen que codifica un miembro de la familia de receptores de tirosina quinasas del factor de crecimiento epidérmico. Esta proteína no tiene dominio de unión a ligando propio y por lo tanto, no puede unirse a factores de crecimiento. Sin embargo, se une estrechamente a otros miembros de la familia de receptores de EGF unidos al ligando para formar un heterodímero, estabilizando la unión del ligando y mejorando la activación mediada por la quinasa de las vías de señalización (Yamamoto et al., 1986).

ERBB2 y *ERBB3* se detectaron en espermatogonias tipo A indiferenciadas y en una línea de células madre espermatogoniales de rata. Los autores analizaron la diversidad de receptores y ligandos de la superfamilia EGF en células de testículo de rata y ofrecieron evidencia de la señalización intrínseca de la línea germinal a través de un co-transductor *ERBB3*, *ERBB2*, esencial para el crecimiento sincitial inducido por el ácido retinoico al diferenciar la espermatogonía (Chapman et al., 2015).

El factor inhibidor de la leucemia (*LIF*), es una citocina pleiotrópica que pertenece a la familia de la interleucina-6, se destaca con mayor frecuencia por su papel en el mantenimiento del equilibrio entre la proliferación y diferenciación de células madre. En roedores, *LIF* se expresa tanto en el testículo fetal como en el adulto; es prescindible en las células germinales para la espermatogénesis normal. De forma interesante se ha reportado que la ablación del receptor de *LIF* en células de Sertoli produce un fenotipo degenerativo, caracterizado por una pérdida anormal de células germinales, estasis de espermatozoides, ectasia de túbulos seminíferos y atrofia posterior de los túbulos seminíferos (Curley et al., 2018).

SMAD4 es un gen que se expresa de forma ubicua en varios órganos, incluidos los testículos. Este gen codifica un miembro de la familia Smad que son proteínas de transducción de señales. Las proteínas Smad son fosforiladas y activadas por las quinasas serina-treonina de receptores transmembrana en respuesta a la señalización factor de crecimiento transformante-beta. El producto de este gen forma complejos homoméricos y complejos heteroméricos con otras proteínas Smad activadas, que luego se acumulan en el núcleo y regulan la transcripción de genes diana (Luukko et al., 2001).

La transcripción de *Smad4* es evidente en células murinas de Sertoli, células de Leydig y germinales, pero no en espermátidas alargadas (Itman & Loveland, 2008). La eliminación constitutiva de *Smad4* sugiere que es esencial para la formación de la línea germinal, en la población precursora de células germinales primordiales en el epiblasto de ratón (Chu et al., 2004; Itman & Loveland, 2008).

Los estudios en ratones indican que Smad4 funciona en el linaje de las células somáticas testiculares, contribuyendo al desarrollo de los testículos y fertilidad (Hao et al., 2016).

AKT-2 es una proteína quinasa de serina / treonina activada por insulina y diversos factores de crecimiento críticos para muchos procesos celulares como el metabolismo de la glucosa, la transcripción, la proliferación celular, la apoptosis, la migración, el crecimiento celular y la tumorigénesis (Kandel & Hay, 1999; Chu et al., 2004; Itman & Loveland, 2008) el fenotipo de infertilidad masculina en los modelos *Akt1* ^{-/-} y *Akt2* ^{-/-} mostraron que la apoptosis en los espermatozoides fueron más frecuentes en ambos ratones nulos en comparación con los ratones de tipo silvestre, mientras que la concentración y la motilidad de los espermatozoides fueron significativamente menores en estos modelos. Las funciones de estas proteínas parecen estar relacionada con la expresión de transportadores de glucosa, posiblemente debido a la disminución de la utilización de glucosa y a la disminución de la supervivencia y posiblemente en relación a las vías de señalización Akt y PTEN / GSK3 β (Kim et al., 2012).

El gen *SGPL1* codifica esfingosina-1-fosfato liasa-1, una enzima del retículo endoplásmico (ER) que participa en el catabolismo de los esfingolípidos. Cataliza el paso final de la vía de descomposición de los esfingolípidos, iniciando la escisión irreversible de la molécula de señalización de lípidos esfingosina-1-fosfato (Kim et al., 2012; Prasad et al., 2017). *SGPL1* en tejidos humanos, muestra niveles moderados de expresión en la corteza suprarrenal y los riñones y altos niveles de expresión en los testículos y la tiroides, se ha descrito su posible participación en la esteroidogénesis (Prasad et al., 2017).

Los factores de transcripción de ETS, como *ETS1*, regulan numerosos genes y están involucrados en el desarrollo de las células madre, la senescencia y muerte celular y del desarrollo tumoral. El dominio ETS conservado dentro de estas proteínas es un dominio de unión al DNA (Dwyer et al., 2007). No existe reportes de posibles mecanismos relacionados en la espermatogénesis.

Algunos genes diana de los miRNAs downregulated, por ejemplo, *ACVR2A*, *CCND1*, *CCNE2*, *HMGA2*, *BMI1*, *NR2C2* y *BCL2*. se han asociado con el desarrollo gonadal y el mantenimiento de las células germinales a través de diferentes vías, que podrían ser relevantes para los mecanismos moleculares afectados en pacientes con SK y azoospermia. Los genes *ACVR2A*, *CCNE2* y *HMGA2* participan en la regulación meiótica durante el desarrollo de células germinales masculinas (Agostino et al., 2004; Souquet et al., 2012; Martinerie et al., 2014; Liu et al., 2016). *NR2C2*, un miembro de la superfamilia de receptores de hormonas nucleares es un factor importante en la espermatogénesis normal; Los ratones knock-out *NR2C2* muestran defectos en los espermatoцитos en paquiteno y diploteno que impiden el progreso y la finalización de las divisiones meióticas (Mu et al., 2004). *BMI1* juega un papel importante en el mantenimiento de las células madre germinales y en su regeneración después de alguna lesión (Mu et al., 2004; Komai et al., 2014).

Se ha demostrado que Bcl-2 inhibe la apoptosis de la espermatogonía y el crecimiento de las CEM de manera intrínseca (Sugiyama et al., 2001). La familia de genes Bcl-2 codifica unas proteínas estrechamente relacionadas que poseen actividad proapoptótica o antiapoptótica (Cory & Adams, 2002). De manera interesante, *BCL2* es un gen diana para los miRNAs que están regulados negativamente en pacientes con KS, por lo que podría se pudiera considerar que la pérdida de las células germinales esté relacionada con la regulación anormal de *BCL2*.

La evidencia de la función de estos genes en la espermatogénesis y el desarrollo, así como su participación en la diferenciación de la espermatogonia, puede explicar cómo las alteraciones en los mecanismos de proliferación de las CEM inhiben el mantenimiento y la supervivencia de las células espermatogonias indiferenciadas, y por lo tanto, anulan la espermatogénesis a largo plazo. Nuestros resultados son consistentes con la evidencia que muestra su papel en la oligozoospermia en SK, pero se necesitan más estudios para evaluar

el papel de estos mecanismos y la regulación de los miRNAs en el fenotipo reproductivo de pacientes con SK.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Primera. Hasta nuestra revisión, este el primer estudio de perfil de expresión de miRNA en tejido testicular de pacientes con Síndrome de Klinefelter.

Segunda. En este estudio se pudo observar un perfil de expresión diferencial de miRNAs en tejido testicular de pacientes con Síndrome de Klinefelter con respecto al grupo control de pacientes con azoospermia obstructiva.

Tercera. Se identificaron los siguientes miRNAs sobreexpresados (upregulated): hsa-miR-654-3p, hsa-miR-127-3p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-199b-3p, en las muestras de tejido testicular de pacientes con Síndrome de Klinefelter con respecto al grupo control.

Cuarta. Se identificaron los siguientes miRNAs infraexpresados (downregulated): hsa-miR-106b-5p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-30c-5p, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23b-3p, hsa-miR-148b-3p, hsa-miR-93-5p and hsa-miR-181a-5p, en las muestras de tejido testicular de pacientes con Síndrome de Klinefelter.

Quinta. El análisis de interacción de los miRNAs con expresión diferencial identificó genes diana involucrados en la espermatogénesis, principalmente en el proceso de diferenciación, desarrollo y mantenimiento de las espermatogonias.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abu-Halima, M., Backes, C., Leidinger, P., Keller, A., Lubbad, A. M., Hammadeh, M., & Meese, E. (2014). MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. In *Fertility and Sterility* (Vol. 101, Issue 1, pp. 78–86.e2).

Abu-Halima, M., Hammadeh, M., Backes, C., Fischer, U., Leidinger, P., Lubbad, A. M., Keller, A., & Meese, E. (2014). Panel of five microRNAs as potential biomarkers for the diagnosis and assessment of male infertility. *Fertility and Sterility*, 102(4), 989–997.e1.

Aeckerle, N., Eildermann, K., Drummer, C., Ehmcke, J., Schweyer, S., Lerchl, A., Bergmann, M., Kliesch, S., Gromoll, J., Schlatt, S., & Behr, R. (2012). The pluripotency factor LIN28 in monkey and human testes: a marker for spermatogonial stem cells? *Molecular Human Reproduction*, 18(10), 477–488.

Agostino, S. D., Di Agostino, S., Fedele, M., Chieffi, P., Fusco, A., Rossi, P., Geremia, R., & Sette, C. (2004). Phosphorylation of High-Mobility Group Protein A2 by Nek2 Kinase during the First Meiotic Division in Mouse Spermatocytes. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 15, Issue 3, pp. 1224–1232).

Aksglaede, L., Jensen, R. B., Carlsen, E., Kok, P., Keenan, D. M., Veldhuis, J., Skakkebaek, N. E., & Juul, A. (2008). Increased basal and pulsatile secretion of FSH and LH in young men with 47,XXY or 46,XX karyotypes. In *European Journal of Endocrinology* (Vol. 158, Issue 6, pp. 803–810).

Aksglaede, L., Petersen, J. H., Main, K. M., Skakkebaek, N. E., & Juul, A. (2007). High normal testosterone levels in infants with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 157(3), 345–350.

Aksglaede, L., Skakkebaek, N. E., Almstrup, K., & Juul, A. (2011). Clinical and biological parameters in 166 boys, adolescents and adults with nonmosaic Klinefelter syndrome: a Copenhagen experience. *Acta Paediatrica*, 100(6), 793–806.

Aksglæde, L., Wikström, A. M., Meyts, E. R.-D., Dunkel, L., Skakkebaek, N. E., & Juul, A. (2006). Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. In *Human Reproduction Update* (Vol. 12, Issue 1, pp. 39–48).

Antonarakis, S. E. (2017). Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 18, Issue 3, pp. 147–163).

Arps, S., Koske-Westphal, T., Meinecke, P., Meschede, D., Nieschlag, E., Harprecht, W., Steuber, E., Back, E., Wolff, G., Kerber, S., & Held, K. R. (1996). Isochromosome Xq in Klinefelter syndrome: report of 7 new cases. *American Journal of Medical Genetics*, 64(4), 580–582.

Bancroft, J., Axworthy, D., & Ratcliffe, S. (1982). The personality and psycho-sexual development of boys with 47 XXY chromosome constitution. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 23(2), 169–180.

Bao, J., Li, D., Wang, L., Wu, J., Hu, Y., Wang, Z., Chen, Y., Cao, X., Jiang, C., Yan, W., & Xu, C. (2012). MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(26), 21686–21698.

Barch, M. J., Knutsen, T., & Spurbeck, J. L. (1997). *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Lippincott Williams & Wilkins.

Barilá, D., & Superti-Furga, G. (1998). An intramolecular SH3-domain interaction regulates c-Abl activity. *Nature Genetics*, 18(3), 280–282.

Bay, K., Hartung, S., Ivell, R., Schumacher, M., Jürgensen, D., Jorgensen, N., Holm, M., Skakkebaek, N. E., & Andersson, A.-M. (2005). Insulin-like factor 3 serum levels in 135 normal men and 85 men with testicular disorders: relationship to the luteinizing hormone-testosterone axis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(6), 3410–3418.

Belling, K., Russo, F., Jensen, A. B., Dalgaard, M. D., Westergaard, D., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N. E., Juul, A., & Brunak, S. (2017). Klinefelter syndrome comorbidities linked to increased X chromosome gene dosage and altered protein interactome activity. *Human Molecular Genetics*, 26(7), 1219–1229.

Berletch, J. B., Yang, F., Xu, J., Carrel, L., & Disteche, C. M. (2011). Genes that escape from X inactivation. *Human Genetics*, 130(2), 237–245.

Blaschke, R. J., & Rappold, G. (2006). The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(3), 233–239.

Bojesen, A., Hertz, J. M., & Gravholt, C. H. (2011). Genotype and phenotype in Klinefelter syndrome - impact of androgen receptor polymorphism and skewed X inactivation. *International Journal of Andrology*, 34(6 Pt 2), e642–e648.

Bojesen, A., Juul, S., Birkebaek, N., & Gravholt, C. H. (2004). Increased mortality in Klinefelter syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(8), 3830–3834.

Bojesen, A., Juul, S., & Gravholt, C. H. (2003). Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(2), 622–626.

Bojesen, A., Kristensen, K., Birkebaek, N. H., Fedder, J., Mosekilde, L., Bennett, P., Laurberg, P., Frystyk, J., Flyvbjerg, A., Christiansen, J. S., & Gravholt, C. H. (2006). The metabolic syndrome is frequent in Klinefelter's syndrome and is associated with abdominal obesity and hypogonadism. *Diabetes Care*, 29(7), 1591–1598.

Bonomi, M., Rochira, V., Pasquali, D., Balercia, G., Jannini, E. A., Ferlin, A., & Klinefelter ItaliaN Group (KING). (2017). Klinefelter syndrome (KS): genetics,

clinical phenotype and hypogonadism. *Journal of Endocrinological Investigation*, 40(2), 123–134.

Bruining, H., Swaab, H., Kas, M., & van Engeland, H. (2009). Psychiatric characteristics in a self-selected sample of boys with Klinefelter syndrome. *Pediatrics*, 123(5), e865–e870.

Bruining, H., van Rijn, S., Swaab, H., Giltay, J., Kates, W., Kas, M. J. H., van Engeland, H., & de Sonnevile, L. (2010). The parent-of-origin of the extra X chromosome may differentially affect psychopathology in Klinefelter syndrome. *Biological Psychiatry*, 68(12), 1156–1162.

Buchold, G. M., Coarfa, C., Kim, J., Milosavljevic, A., Gunaratne, P. H., & Matzuk, M. M. (2010). Analysis of microRNA expression in the prepubertal testis. *PloS One*, 5(12), e15317.

Bukulmez, O. (2012). Genetic Aspects of Male Infertility. In *Male Infertility* (pp. 171–189).

Bult, C. J., Blake, J. A., Smith, C. L., Kadin, J. A., Richardson, J. E., & Mouse Genome Database Group. (2019). Mouse Genome Database (MGD) 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D801–D806.

Campbell, W. A., & Price, W. H. (1981). Venous thromboembolic disease in Klinefelter's syndrome. *Clinical Genetics*, 19(4), 275–280.

Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642–655.

Cedar, H., & Bergman, Y. (2009). Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature Reviews. Genetics*, 10(5), 295–304.

Chalmel, F., Rolland, A. D., Niederhauser-Wiederkehr, C., Chung, S. S. W., Demougin, P., Gattiker, A., Moore, J., Patard, J.-J., Wolgemuth, D. J., Jégou, B., & Primig, M. (2007). The conserved transcriptome in human and rodent male gametogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(20), 8346–8351.

Chamberlain, N. L., Driver, E. D., & Miesfeld, R. L. (1994). The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Research*, 22(15), 3181–3186.

Chang, S., Skakkebak, A., Trolle, C., Bojesen, A., Hertz, J. M., Cohen, A., Hougaard, D. M., Wallentin, M., Pedersen, A. D., Østergaard, J. R., & Gravholt, C. H. (2015). Anthropometry in Klinefelter syndrome--multifactorial influences due to CAG length, testosterone treatment and possibly intrauterine hypogonadism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(3), E508–E517.

Chan, Y.-F., Tang, F., & O, W.-S. (2008). Adrenomedullin in the rat testis. II: Its production, actions on inhibin secretion, regulation by follicle-stimulating

hormone, and its interaction with endothelin 1 in the Sertoli cell. *Biology of Reproduction*, 78(4), 780–785.

Chapman, K. M., Medrano, G. A., Chaudhary, J., & Hamra, F. K. (2015). NRG1 and KITL Signal Downstream of Retinoic Acid in the Germline to Support Soma-Free Syncytial Growth of Differentiating Spermatogonia. *Cell Death Discovery*, 1.

Chen, P. J., Singal, A., Kimble, J., & Ellis, R. E. (2000). A novel member of the tob family of proteins controls sexual fate in *Caenorhabditis elegans* germ cells. *Developmental Biology*, 217(1), 77–90.

Chu, G. C., Dunn, N. R., Anderson, D. C., Oxburgh, L., & Robertson, E. J. (2004). Differential requirements for Smad4 in TGFbeta-dependent patterning of the early mouse embryo. *Development*, 131(15), 3501–3512.

Cimino, L., Salemi, M., Cannarella, R., Condorelli, R. A., Giurato, G., Marchese, G., La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2017). Decreased miRNA expression in Klinefelter syndrome. *Scientific Reports*, 7(1), 16672.

Coerdts, W., Rehder, H., Gausmann, I., Johannisson, R., & Gropp, A. (1985). Quantitative histology of human fetal testes in chromosomal disease. *Pediatric Pathology / Affiliated with the International Paediatric Pathology Association*, 3(2-4), 245–259.

Corona, G., Pizzocaro, A., Lanfranco, F., Garolla, A., Pelliccione, F., Vignozzi, L., Ferlin, A., Foresta, C., Jannini, E. A., Maggi, M., Lenzi, A., Pasquali, D., Francavilla, S., & Klinefelter ItaliaN Group (KING). (2017). Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 23(3), 265–275.

Cory, S., & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 2, Issue 9, pp. 647–656).

Curley, M., Milne, L., Smith, S., Atanassova, N., Rebourcet, D., Darbey, A., Hadoke, P. W. F., Wells, S., & Smith, L. B. (2018). Leukemia Inhibitory Factor-Receptor is Dispensable for Prenatal Testis Development but is Required in Sertoli cells for Normal Spermatogenesis in Mice. *Scientific Reports*, 8(1), 11532.

D'Aurora, M., Ferlin, A., Di Nicola, M., Garolla, A., De Toni, L., Franchi, S., Palka, G., Foresta, C., Stuppia, L., & Gatta, V. (2015). Deregulation of sertoli and leydig cells function in patients with Klinefelter syndrome as evidenced by testis transcriptome analysis. *BMC Genomics*, 16, 156.

D'Aurora, M., Ferlin, A., Garolla, A., Franchi, S., D'Onofrio, L., Trubiani, O., Palka, G., Foresta, C., Stuppia, L., & Gatta, V. (2017). Testis Transcriptome Modulation in Klinefelter Patients with Hypospermatogenesis. *Scientific Reports*, 7, 45729.

Davis, S. M., Rogol, A. D., & Ross, J. L. (2015). Testis Development and Fertility Potential in Boys with Klinefelter Syndrome. *Endocrinology and*

Metabolism Clinics of North America, 44(4), 843–865.

Disteche, C. M., Filippova, G. N., & Tsuchiya, K. D. (2002). Escape from X inactivation. *Cytogenetic and Genome Research*, 99(1-4), 36–43.

Duriez, C., Falette, N., Audouy, C., Moyret-Lalle, C., Bensaad, K., Courtois, S., Wang, Q., Soussi, T., & Puisieux, A. (2002). The human BTG2/TIS21/PC3 gene: genomic structure, transcriptional regulation and evaluation as a candidate tumor suppressor gene. *Gene*, 282(1-2), 207–214.

Dwyer, J., Li, H., Xu, D., & -P. Liu, J. (2007). Transcriptional Regulation of Telomerase Activity: Roles of the the Ets Transcription Factor Family. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1114, Issue 1, pp. 36–47).

Edlow, J. B. (1969). Neonatal Klinefelter's Syndrome. In *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* (Vol. 118, Issue 5, p. 788).

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), 457–463.

Eid, W., & Biason-Lauber, A. (2016). Why boys will be boys and girls will be girls: Human sex development and its defects. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, 108(4), 365–379.

Fan, Y., Siklenka, K., Arora, S. K., Ribeiro, P., Kimmins, S., & Xia, J. (2016). miRNet - dissecting miRNA-target interactions and functional associations through network-based visual analysis. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 44, Issue W1, pp. W135–W141).

Fan, Y., & Xia, J. (2018). miRNet—Functional Analysis and Visual Exploration of miRNA–Target Interactions in a Network Context. In *Methods in Molecular Biology* (pp. 215–233).

Ferlin, A., Zuccarello, D., Zuccarello, B., Chirico, M. R., Zanon, G. F., & Foresta, C. (2008). Genetic alterations associated with cryptorchidism. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 300(19), 2271–2276.

Fonseka, K. G. L., & Griffin, D. K. (2011). Is there a paternal age effect for aneuploidy? *Cytogenetic and Genome Research*, 133(2-4), 280–291.

Foresta, C., Galeazzi, C., Bettella, A., Marin, P., Rossato, M., Garolla, A., & Ferlin, A. (1999). Analysis of meiosis in intratesticular germ cells from subjects affected by classic Klinefelter's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(10), 3807–3810.

Frühmesser, A., & Kotzot, D. (2011). Chromosomal variants in klinefelter syndrome. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, 5(3), 109–123.

Gai, X., Perin, J. C., Murphy, K., O'Hara, R., D'arcy, M., Wenocur, A., Xie, H. M., Rappaport, E. F., Shaikh, T. H., & White, P. S. (2010). CNV Workshop: an integrated platform for high-throughput copy number variation discovery and clinical diagnostics. In *BMC Bioinformatics* (Vol. 11, Issue 1, p. 74).

Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature Reviews. Genetics*, 10(2), 94–108.

Giedd, J. N., Clasen, L. S., Wallace, G. L., Lenroot, R. K., Lerch, J. P., Wells, E. M., Blumenthal, J. D., Nelson, J. E., Tossell, J. W., Stayer, C., Evans, A. C., & Samango-Sprouse, C. A. (2007). XXY (Klinefelter syndrome): a pediatric quantitative brain magnetic resonance imaging case-control study. *Pediatrics*, 119(1), e232–e240.

Gravholt, C. H., Chang, S., Wallentin, M., Fedder, J., Moore, P., & Skakkebaek, A. (2018). Klinefelter Syndrome: Integrating Genetics, Neuropsychology, and Endocrinology. *Endocrine Reviews*, 39(4), 389–423.

Grive, K. J., Hu, Y., Shu, E., Grimson, A., Elemento, O., Grenier, J. K., & Cohen, P. E. (2019). Dynamic transcriptome profiles within spermatogonial and spermatocyte populations during postnatal testis maturation revealed by single-cell sequencing. *PLoS Genetics*, 15(3), e1007810.

Grossman, H., & Shalgi, R. (2016). A Role of MicroRNAs in Cell Differentiation During Gonad Development. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 58, 309–336.

Groth, K. A., Skakkebaek, A., Høst, C., Gravholt, C. H., & Bojesen, A. (2013). Clinical review: Klinefelter syndrome--a clinical update. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(1), 20–30.

Guarnaccia, C., Pintar, A., & Pongor, S. (2004). Exon 6 of human Jagged-1 encodes an autonomously folding unit. *FEBS Letters*, 574(1-3), 156–160.

Hadziselimovic, F., Zivkovic, D., Bica, D. T. G., & Emmons, L. R. (2005). The importance of mini-puberty for fertility in cryptorchidism. *The Journal of Urology*, 174(4 Pt 2), 1536–1539; discussion 1538–1539.

Hao, X.-X., Chen, S.-R., Tang, J.-X., Li, J., Cheng, J.-M., Jin, C., Wang, X.-X., & Liu, Y.-X. (2016). Selective deletion of Smad4 in postnatal germ cells does not affect spermatogenesis or fertility in mice. *Molecular Reproduction and Development*, 83(7), 615–623.

Hashimi, S. T., Fulcher, J. A., Chang, M. H., Gov, L., Wang, S., & Lee, B. (2009). MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. *Blood*, 114(2), 404–414.

He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 5, Issue 7, pp. 522–531).

He, Z., Jiang, J., Kokkinaki, M., Tang, L., Zeng, W., Gallicano, I., Dobrinski, I., & Dym, M. (2013). MiRNA-20 and mirna-106a regulate spermatogonial stem cell renewal at the post-transcriptional level via targeting STAT3 and Ccnd1. *Stem Cells*, 31(10), 2205–2217.

Huang, J., Zhang, L., Deng, H., Chang, L., Liu, Q., & Liu, P. (2015). Global transcriptome analysis of peripheral blood identifies the most significantly down-regulated genes associated with metabolism regulation in Klinefelter syndrome.

Molecular Reproduction and Development, 82(1), 17–25.

Huang, Z., Tang, D., Gao, J., Dou, X., Cheng, P., Peng, D., Zhang, Y., Mao, J., Zhang, L., & Zhang, X. (2018). miR-34c disrupts spermatogonial stem cell homeostasis in cryptorchid testes by targeting Nanos2. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 16(1), 97.

Hughes, I. A. (2001). Minireview: sex differentiation. *Endocrinology*, 142(8), 3281–3287.

Hunt, P. A., Worthman, C., Levinson, H., Stallings, J., LeMaire, R., Mroz, K., Park, C., & Handel, M. A. (1998). Germ cell loss in the XXY male mouse: altered X-chromosome dosage affects prenatal development. *Molecular Reproduction and Development*, 49(2), 101–111.

Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., & Masaki, T. (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(8), 2863–2867.

Itman, C., & Loveland, K. L. (2008). SMAD expression in the testis: an insight into BMP regulation of spermatogenesis. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 237(1), 97–111.

Jacobs, P. A., Baikie, A. G., Court Brown, W. M., Forrest, H., Roy, J. R., Stewart, J. S., & Lennox, B. (1959). Chromosomal sex in the syndrome of testicular feminisation. *The Lancet*, 2(7103), 591–592.

Jan, S. Z., Vormer, T. L., Jongejan, A., Röling, M. D., Silber, S. J., de Rooij, D. G., Hamer, G., Repping, S., & van Pelt, A. M. M. (2017). Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis. *Development*, 144(20), 3659–3673.

Kanatsu-Shinohara, M., & Shinohara, T. (2013). Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 29, 163–187.

Kandel, E. S., & Hay, N. (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Experimental Cell Research*, 253(1), 210–229.

Khazaie, Y., & Nasr Esfahani, M. H. (2014). MicroRNA and Male Infertility: A Potential for Diagnosis. *International Journal of Fertility & Sterility*, 8(2), 113–118.

Kim, S. T., Omurtag, K., & Moley, K. H. (2012). Decreased spermatogenesis, fertility, and altered Slc2A expression in Akt1^{-/-} and Akt2^{-/-} testes and sperm. *Reproductive Sciences*, 19(1), 31–42.

Klinefelter, H. F., Reifenstein, E. C., & Albright, F. (1942). Syndrome Characterized by Gynecomastia, Aspermatogenesis without A-Leydigism, and Increased Excretion of Follicle-Stimulating Hormone1. In *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (Vol. 2, Issue 11, pp. 615–627).

Komai, Y., Tanaka, T., Tokuyama, Y., Yanai, H., Ohe, S., Omachi, T., Atsumi, N., Yoshida, N., Kumano, K., Hisha, H., Matsuda, T., & Ueno, H. (2014). Bmi1 expression in long-term germ stem cells. *Scientific Reports*, 4, 6175.

Kotaja, N. (2014). MicroRNAs and spermatogenesis. *Fertility and Sterility*, 101(6), 1552–1562.

Kui, F., Ye, H., Chen, X.-L., & Zhang, J. (2019). Microarray meta-analysis identifies candidate genes for human spermatogenic arrest. *Andrologia*, 51(8), e13301.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853–858.

Lahlou, N., & Roger, M. (2004). Inhibin B in pubertal development and pubertal disorders. *Seminars in Reproductive Medicine*, 22(3), 165–175.

Laiho, A., Kotaja, N., Gyenesei, A., & Sironen, A. (2013). Transcriptome profiling of the murine testis during the first wave of spermatogenesis. *PloS One*, 8(4), e61558.

Lanfranco, F., Kamischke, A., Zitzmann, M., & Nieschlag, E. (2004). Klinefelter's syndrome. *The Lancet*, 364(9430), 273–283.

Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., & Chen, C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*, 8, 166.

Lian, J., Zhang, X., Tian, H., Liang, N., Wang, Y., Liang, C., Li, X., & Sun, F. (2009). Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 7, 13.

Liu, C., Rodriguez, K., & -C. Yao, H. H. (2016). Mapping lineage progression of somatic progenitor cells in the mouse fetal testis. In *Development* (Vol. 143, Issue 20, pp. 3700–3710).

Liu, Y., Niu, M., Yao, C., Hai, Y., Yuan, Q., Liu, Y., Guo, Y., Li, Z., & He, Z. (2015). Fractionation of human spermatogenic cells using STA-PUT gravity sedimentation and their miRNA profiling. *Scientific Reports*, 5, 8084.

Lue, Y.-H., Wang, C., Liu, P. Y., Erkill, K., & Swerdloff, R. S. (2010). Insights into the pathogenesis of XXY phenotype from comparison of the clinical syndrome with an experimental XXY mouse model. *Pediatric Endocrinology Reviews: PER*, 8 Suppl 1, 140–144.

Luukko, K., Ylikorkala, A., & Mäkelä, T. P. (2001). Developmentally regulated expression of Smad3, Smad4, Smad6, and Smad7 involved in TGF-beta signaling. *Mechanisms of Development*, 101(1-2), 209–212.

Lyon, M. F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 190, 372–373.

Mangs, A. H., Helena Mangs, A., & Morris, B. (2007). The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. In *Current Genomics*

(Vol. 8, Issue 2, pp. 129–136).

Marchini, A., Rappold, G., & Schneider, K. U. (2007). SHOX at a glance: from gene to protein. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 113(3), 116–123.

Martinerie, L., Manterola, M., Chung, S. S. W., Panigrahi, S. K., Weisbach, M., Vasileva, A., Geng, Y., Sicinski, P., & Wolgemuth, D. J. (2014). Mammalian E-type cyclins control chromosome pairing, telomere stability and CDK2 localization in male meiosis. *PLoS Genetics*, 10(2), e1004165.

Melton, C. & Blelloch, R. MicroRNA Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. (2010) *Adv. Exp. Med. Biol.* **695**, 105–117 .

Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., Ebert, D., Mills, C., Guo, X., & Thomas, P. D. (2019). Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nature Protocols*, 14(3), 703–721.

Mikamo, K., AguerCIF, M., Hazeghi, P., & Martin-Du Pan, R. (1968). Chromatin-positive Klinefelter's syndrome. A quantitative analysis of spermatogonial deficiency at 3, 4, and 12 months of age. *Fertility and Sterility*, 19(5), 731–739.

Miller, M. P., Amon, A., & Ünal, E. (2013). Meiosis I: when chromosomes undergo extreme makeover. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(6), 687–696.

Mohandas, T. K., Speed, R. M., Passage, M. B., Yen, P. H., Chandley, A. C., & Shapiro, L. J. (1992). Role of the pseudoautosomal region in sex-chromosome pairing during male meiosis: meiotic studies in a man with a deletion of distal Xp. *American Journal of Human Genetics*, 51(3), 526–533.

Moss, E. G., & Tang, L. (2003). Conservation of the heterochronic regulator Lin-28, its developmental expression and microRNA complementary sites. *Developmental Biology*, 258(2), 432–442.

Müller, J., Skakkebaek, N. E., & Ratcliffe, S. G. (1995). Quantified testicular histology in boys with sex chromosome abnormalities. *International Journal of Andrology*, 18(2), 57–62.

Mu, X., Lee, Y.-F., Liu, N.-C., Chen, Y.-T., Kim, E., Shyr, C.-R., & Chang, C. (2004). Targeted Inactivation of Testicular Nuclear Orphan Receptor 4 Delays and Disrupts Late Meiotic Prophase and Subsequent Meiotic Divisions of Spermatogenesis. In *Molecular and Cellular Biology* (Vol. 24, Issue 13, pp. 5887–5899).

Nielsen, J., & WohlerT, M. (1991). Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Arhus, Denmark. *Human Genetics*, 87(1), 81–83.

Nistal, M., Paniagua, R., Abaurrea, M. A., & Santamaría, L. (1982). Hyperplasia and the immature appearance of Sertoli cells in primary testicular disorders. *Human Pathology*, 13(1), 3–12.

Niu, Z., Goodyear, S. M., Rao, S., Wu, X., Tobias, J. W., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2011). MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse

spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12740–12745.

Oates, R. D. (2012). The natural history of endocrine function and spermatogenesis in Klinefelter syndrome: what the data show. *Fertility and Sterility*, 98(2), 266–273.

Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., Saitou, M., & Surani, M. A. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*, 436(7048), 207–213.

Parekh, P. A., Garcia, T. X., Waheeb, R., Jain, V., Gandhi, P., Meistrich, M. L., Shetty, G., & Hofmann, M.-C. (2019). Undifferentiated spermatogonia regulate Cyp26b1 expression through NOTCH signaling and drive germ cell differentiation. In *The FASEB Journal* (Vol. 33, Issue 7, pp. 8423–8435).

Penny, G. D., Kay, G. F., Sheardown, S. A., Rastan, S., & Brockdorff, N. (1996). Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*, 379(6561), 131–137.

Pessia, E., Makino, T., Bailly-Bechet, M., McLysaght, A., & Marais, G. A. B. (2012). Mammalian X chromosome inactivation evolved as a dosage-compensation mechanism for dosage-sensitive genes on the X chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), 5346–5351.

Phillips, B. T., Gassei, K., & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 365, Issue 1546, pp. 1663–1678).

Poplinski, A., Wieacker, P., Kliesch, S., & Gromoll, J. (2010). Severe XIST hypomethylation clearly distinguishes (SRY) 46,XX-male from Klinefelter syndrome. In *European Journal of Endocrinology* (Vol. 162, Issue 1, pp. 169–175).

Prasad, R., Hadjidemetriou, I., Maharaj, A., Meimaridou, E., Buonocore, F., Saleem, M., Hurcombe, J., Bierzynska, A., Barbagelata, E., Bergadá, I., Cassinelli, H., Das, U., Krone, R., Hacıhamdioglu, B., Sari, E., Yesilkaya, E., Storr, H. L., Clemente, M., Fernandez-Cancio, M., ... Metherell, L. A. (2017). Sphingosine-1-phosphate lyase mutations cause primary adrenal insufficiency and steroid-resistant nephrotic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(3), 942–953.

Qiu, Q., Liu, G., Li, W., Shi, Q., Zhu, F., & Lu, G. (2009). Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 gene is involved in mouse spermatogenesis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 41(8), 668–676.

Ratcliffe, S. (1999). Long term outcome in children of sex chromosome abnormalities. In *Archives of Disease in Childhood* (Vol. 80, Issue 2, pp. 192–195).

Ratcliffe, S. G. (1982). Speech and learning disorders in children with sex chromosome abnormalities. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 24(1), 80–84.

Rocca, M. S., Pecile, V., Cleva, L., Speltra, E., Selice, R., Di Mambro, A., Foresta, C., & Ferlin, A. (2016). The Klinefelter syndrome is associated with high

recurrence of copy number variations on the X chromosome with a potential role in the clinical phenotype. *Andrology*, 4(2), 328–334.

Ross, J. L., Samango-Sprouse, C., Lahlou, N., Kowal, K., Elder, F. F., & Zinn, A. (2005). Early androgen deficiency in infants and young boys with 47,XXY Klinefelter syndrome. *Hormone Research*, 64(1), 39–45.

Rovenský, J. (2006). Rheumatic diseases and Klinefelter's syndrome. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 6, Issue 1, pp. 33–36).

Ruigrok, A. N. V., Salimi-Khorshidi, G., Lai, M.-C., Baron-Cohen, S., Lombardo, M. V., Tait, R. J., & Suckling, J. (2014). A meta-analysis of sex differences in human brain structure. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 39, 34–50.

Saito, R., Smoot, M. E., Ono, K., Ruscheinski, J., Wang, P.-L., Lotia, S., Pico, A. R., Bader, G. D., & Ideker, T. (2012). A travel guide to Cytoscape plugins. *Nature Methods*, 9(11), 1069–1076.

Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F, Godo A, Grossmann M, Pons MC, F-Fernández S, Garrido N, Anton E. Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential micro-ribonucleic acid profile. *Fertil Steril*. 2015 Sep;104(3):591-601.

Sawalha, A. H., Harley, J. B., & Scofield, R. H. (2009). Autoimmunity and Klinefelter's syndrome: when men have two X chromosomes. *Journal of Autoimmunity*, 33(1), 31–34.

Schwartzberg, P. L., Stall, A. M., Hardin, J. D., Bowdish, K. S., Humaran, T., Boast, S., Harbison, M. L., Robertson, E. J., & Goff, S. P. (1991). Mice homozygous for the *abl*m1 mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. In *Cell* (Vol. 65, Issue 7, pp. 1165–1175).

Selice, R., Di Mambro, A., Garolla, A., Ficarra, V., Iafrate, M., Ferlin, A., & Foresta, C. (2010). Spermatogenesis in Klinefelter syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*, 33(11), 789–793.

Seminog, O. O., Seminog, A. B., Yeates, D., & Goldacre, M. J. (2015). Associations between Klinefelter's syndrome and autoimmune diseases: English national record linkage studies. *Autoimmunity*, 48(2), 125–128.

Sharma, A., Jamil, M. A., Nuesgen, N., Schreiner, F., Priebe, L., Hoffmann, P., HERN, S., Nöthen, M. M., Fröhlich, H., Oldenburg, J., Woelfle, J., & El-Maarri, O. (2015). DNA methylation signature in peripheral blood reveals distinct characteristics of human X chromosome numerical aberrations. *Clinical Epigenetics*, 7, 76.

Shekarabi, M., Lafrenière, R. G., Gaudet, R., Laganière, J., Marcinkiewicz, M. M., Dion, P. A., & Rouleau, G. A. (2013). Comparative analysis of the expression profile of *Wnk1* and *Wnk1/Hsn2* splice variants in developing and adult mouse tissues. *PloS One*, 8(2), e57807.

Skakkebaek, A., Wallentin, M., & Gravholt, C. H. (2015). Neuropsychology and socioeconomic aspects of Klinefelter syndrome: new developments. *Current*

Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity, 22(3), 209–216.

Smith, M. A., Maurin, M., Cho, H. I., Becknell, B., Freud, A. G., Yu, J., Wei, S., Djeu, J., Celis, E., Caligiuri, M. A., & Wright, K. L. (2010). PRDM1/Blimp-1 Controls Effector Cytokine Production in Human NK Cells. In *The Journal of Immunology* (Vol. 185, Issue 10, pp. 6058–6067).

Song, R., Ro, S., Michaels, J. D., Park, C., McCarrey, J. R., & Yan, W. (2009). Many X-linked microRNAs escape meiotic sex chromosome inactivation. *Nature Genetics*, 41(4), 488–493.

Souquet, B., Tourpin, S., Messiaen, S., Moison, D., Habert, R., & Livera, G. (2012). Nodal Signaling Regulates the Entry into Meiosis in Fetal Germ Cells. In *Endocrinology* (Vol. 153, Issue 5, pp. 2466–2473).

Stemkens, D., Roza, T., Verrij, L., Swaab, H., van Werkhoven, M. K., Alizadeh, B. Z., Sinke, R. J., & Giltay, J. C. (2006). Is there an influence of X-chromosomal imprinting on the phenotype in Klinefelter syndrome? A clinical and molecular genetic study of 61 cases. *Clinical Genetics*, 70(1), 43–48.

Sugiyama, N., Obinata, M., & Matsui, Y. (2001). Bcl-2 inhibits apoptosis of spermatogonia and growth of spermatogonial stem cells in a cell-intrinsic manner. In *Molecular Reproduction and Development* (Vol. 58, Issue 1, pp. 30–38).

Sui, W., Ou, M., Chen, J., Li, H., Lin, H., Zhang, Y., Li, W., Xue, W., Tang, D., Gong, W., Zhang, R., Li, F., & Dai, Y. (2012). microRNA expression profile of peripheral blood mononuclear cells of Klinefelter syndrome. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 4(5), 825–831.

Swerdlow, A. J., Higgins, C. D., Schoemaker, M. J., Wright, A. F., Jacobs, P. A., & United Kingdom Clinical Cytogenetics Group. (2005). Mortality in patients with Klinefelter syndrome in Britain: a cohort study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(12), 6516–6522.

Swerdlow, A. J., Schoemaker, M. J., Higgins, C. D., Wright, A. F., Jacobs, P. A., & UK Clinical Cytogenetics Group. (2006). Cancer Incidence and Mortality in Men With Klinefelter Syndrome: A Cohort Study. In *Journal of Urology* (Vol. 175, Issue 4, pp. 1364–1365).

Tannour-Louet, M., Han, S., Louet, J.-F., Zhang, B., Romero, K., Addai, J., Sahin, A., Cheung, S. W., & Lamb, D. J. (2014). Increased gene copy number of VAMP7 disrupts human male urogenital development through altered estrogen action. *Nature Medicine*, 20(7), 715–724.

Thornton, J. E., Chang, H.-M., Piskounova, E. & Gregory, R. I. Lin28-mediated control of let-7 microRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7). (2012) *RNA* 18, 1875–1885.

Tong, M.-H., Mitchell, D., Evanoff, R., & Griswold, M. D. (2011). Expression of Mirlet7 family microRNAs in response to retinoic acid-induced spermatogonial differentiation in mice. *Biology of Reproduction*, 85(1), 189–197.

Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. In *Nature Reviews*

Molecular Cell Biology (Vol. 20, Issue 1, pp. 5–20).

Tseng, Y.-T., Liao, H.-F., Yu, C.-Y., Mo, C.-F., & Lin, S.-P. (2015). Epigenetic factors in the regulation of prospermatogonia and spermatogonial stem cells. *Reproduction*, 150(3), R77–R91.

Turner, J. M. A. (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. In *Development* (Vol. 134, Issue 10, pp. 1823–1831).

Viana, J., Pidsley, R., Troakes, C., Spiers, H., Wong, C. C., Al-Sarraj, S., Craig, I., Schalkwyk, L., & Mill, J. (2014). Epigenomic and transcriptomic signatures of a Klinefelter syndrome (47,XXY) karyotype in the brain. *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society*, 9(4), 587–599.

Visootsak, J., Aylstock, M., & Graham, J. M., Jr. (2001). Klinefelter syndrome and its variants: an update and review for the primary pediatrician. *Clinical Pediatrics*, 40(12), 639–651.

Werler, S., Demond, H., Damm, O. S., Ehmcke, J., Middendorff, R., Gromoll, J., & Wistuba, J. (2014). Germ cell loss is associated with fading Lin28a expression in a mouse model for Klinefelter's syndrome. *Reproduction*, 147(3), 253–264.

West, J. A., Viswanathan, S. R., Yabuuchi, A., Cunniff, K., Takeuchi, A., Park, I.-H., Sero, J. E., Zhu, H., Perez-Atayde, A., Frazier, A. L., Surani, M. A., & Daley, G. Q. (2009). A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature*, 460(7257), 909–913.

Wikström, A. M., Bay, K., Hero, M., Andersson, A.-M., & Dunkel, L. (2006). Serum insulin-like factor 3 levels during puberty in healthy boys and boys with Klinefelter syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(11), 4705–4708.

Wikström, A. M., Painter, J. N., Raivio, T., Aittomäki, K., & Dunkel, L. (2006). Genetic features of the X chromosome affect pubertal development and testicular degeneration in adolescent boys with Klinefelter syndrome. *Clinical Endocrinology*, 65(1), 92–97.

Wikström, A. M., Raivio, T., Hadziselimovic, F., Wikström, S., Tuuri, T., & Dunkel, L. (2004). Klinefelter Syndrome in Adolescence: Onset of Puberty Is Associated with Accelerated Germ Cell Depletion. In *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (Vol. 89, Issue 5, pp. 2263–2270).

Winge, S. B., Dalgaard, M. D., Belling, K. G., Jensen, J. M., Nielsen, J. E., Aksglaede, L., Schierup, M. H., Brunak, S., Skakkebaek, N. E., Juul, A., Rajpert-De Meyts, E., & Almstrup, K. (2018). Transcriptome analysis of the adult human Klinefelter testis and cellularity-matched controls reveals disturbed differentiation of Sertoli- and Leydig cells. *Cell Death & Disease*, 9(6), 586.

Winge, S. B., Nielsen, J., Jorgensen, A., Owczarek, S., Ewen, K. A., Nielsen, J. E., Juul, A., Berezin, V., & Rajpert-De Meyts, E. (2018). Corrigendum to “Biglycan is a novel binding partner of fibroblast growth factor receptor 3c (FGFR3c) in the human testis” [Mol. Cell Endocrinol.] 399 (2015) 235-243. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 460, 258.

- Wu, L., & Belasco, J. G. (2005). Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biology*, 25(21), 9198–9208.
- Wu, W., Hu, Z., Qin, Y., Dong, J., Dai, J., Lu, C., Zhang, W., Shen, H., Xia, Y., & Wang, X. (2012). Seminal plasma microRNAs: potential biomarkers for spermatogenesis status. *Molecular Human Reproduction*, 18(10), 489–497.
- Xu, X., Toselli, P. A., Russell, L. D., & Seldin, D. C. (1999). Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II alpha' catalytic subunit. *Nature Genetics*, 23(1), 118–121.
- Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T., & Toyoshima, K. (1986). Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature*, 319(6050), 230–234.
- Yang, C., Chapman, A. G., Kelsey, A. D., Minks, J., Cotton, A. M., & Brown, C. J. (2011). X-chromosome inactivation: molecular mechanisms from the human perspective. *Human Genetics*, 130(2), 175–185.
- Yang, Q.-E., -E. Yang, Q., Racicot, K. E., Kaucher, A. V., Oatley, M. J., & Oatley, J. M. (2013). MicroRNAs 221 and 222 regulate the undifferentiated state in mammalian male germ cells. In *Development* (Vol. 140, Issue 2, pp. 280–290).
- Yan, N., Lu, Y., Sun, H., Tao, D., Zhang, S., Liu, W., & Ma, Y. (2007). A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction*, 134(1), 73–79.
- Yoshinaga, K., Nishikawa, S., Ogawa, M., Hayashi, S., Kunisada, T., Fujimoto, T., & Nishikawa, S. (1991). Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development*, 113(2), 689–699.
- Yu, Y.-H., Siao, F.-P., Hsu, L. C.-L., & Yen, P. H. (2012). TEX11 modulates germ cell proliferation by competing with estrogen receptor β for the binding to HPIP. *Molecular Endocrinology*, 26(4), 630–642.
- Zheng, K., Wu, X., Kaestner, K. H., & Wang, P. J. (2009). The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Developmental Biology*, 9, 38.
- Zhou, Z., Shirakawa, T., Ohbo, K., Sada, A., Wu, Q., Hasegawa, K., Saba, R., & Saga, Y. (2015). RNA Binding Protein Nanos2 Organizes Post-transcriptional Buffering System to Retain Primitive State of Mouse Spermatogonial Stem Cells. In *Developmental Cell* (Vol. 34, Issue 1, pp. 96–107).
- Zivkovic, D., & Hadziselimovic, F. (2009). Development of Sertoli cells during mini-puberty in normal and cryptorchid testes. *Urologia Internationalis*, 82(1), 89–91.